

EVOLUCIÓN Y DESARROLLO DE LA GLÁNDULA ANULAR DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*

TESIS DOCTORAL

CARLOS SÁNCHEZ HIGUERAS

Centro
Andaluz
de Biología
del Desarrollo



UNIVERSIDAD
PABLO DE OLAVIDE
SEVILLA

Imagen portada: Imagen de microscopía confocal de un embrión de *Drosophila melanogaster* (st15), donde se muestra la fusión de las glándulas endocrinas: el *corpora allata* (CA), la glándula protorácica (GP) y el *corpora cardiaca* (CC). El CA y la GP, expresan GFP de membrana (verde; *snail*-rg eGFP) y el CC se visualiza mediante una tinción con anti-Fasciclin II (gris). En rojo se muestra la tinción con anti-aPKC.

Imagen contraportada: Imagen de microscopía confocal, donde se muestra una visión dorsal de un embrión de *Drosophila melanogaster* (st14). Se observa el primordio CA/GP (gris; *snail*-rg eGFP) durante su migración dorsal, así como las ramas traqueales dorsales (rojo; *btl*-RFP). El color azul corresponde a la tinción con anti-aPKC.

**Centro
Andaluz
de Biología
del Desarrollo**



CENTRO ANDALUZ DE BIOLOGÍA DEL DESARROLLO

UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA,
INGENIERÍA Y TECNOLOGÍA QUÍMICA**

**EVOLUCIÓN Y DESARROLLO DE LA GLÁNDULA
ANULAR DE *DROSOPHILA MELANOGASTER***

TESIS DOCTORAL

CARLOS SÁNCHEZ HIGUERAS

SEVILLA, 2017

Centro
Andaluz
de Biología
del Desarrollo



CENTRO ANDALUZ DE BIOLOGÍA DEL DESARROLLO

UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE

EVOLUCIÓN Y DESARROLLO DE LA GLÁNDULA ANULAR DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Memoria de tesis doctoral presentada por el
Licenciado en Biología,

Carlos Sánchez Higuera

para optar al Grado de Doctor por la Universidad
Pablo de Olavide

*Esta tesis doctoral ha sido realizada en el Centro Andaluz de
Biología del Desarrollo (CSIC, UPO, JA)*



Centro
Andaluz
de Biología
del Desarrollo



El Dr. James Castelli-Gair Hombría, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Director del Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD) y Profesor adscrito al Programa de Doctorado en Biotecnología, Ingeniería y Tecnología Química de la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla (UPO),

CERTIFICA:

Que el Licenciado Carlos Sánchez Higuera ha realizado bajo su dirección y tutela, el trabajo titulado: “Evolución y Desarrollo de la Glándula Anular de *Drosophila melanogaster*”. El cual reúne los requisitos de originalidad y calidad científica necesarios para optar al Grado de Doctor por la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla.

Y para que así conste, expido el presente certificado en Sevilla, a 20 de Abril de 2017.

Fdo.:

Dr. James Castelli-Gair Hombría

Director de Tesis y Tutor

Fdo.:

Carlos Sánchez Higuera

Doctorando



El Dr. James Castelli-Gair Hombría, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Director del Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD) y Profesor adscrito al Programa de Doctorado en Biotecnología, Ingeniería y Tecnología Química de la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla (UPO),

CERTIFICA:

Que el Licenciado Carlos Sánchez Higuera ha realizado bajo su dirección y tutela, el trabajo titulado: "Evolución y Desarrollo de la Glándula Anular de *Drosophila melanogaster*". El cual reúne los requisitos de originalidad y calidad científica necesarios para optar al Grado de Doctor por la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla.

Y para que así conste, expido el presente certificado en Sevilla, a 20 de Abril de 2017.

Fdo.: 

Dr. James Castelli-Gair Hombría

Director de Tesis y Tutor

La presente tesis doctoral, ha sido depositada como un compendio de tres publicaciones. Dos artículos y un capítulo de libro:

- **Artículos**

*Sánchez-Higueras, C., Sotillos, S. and Castelli-Gair Hombría J. (2014). *Common origin of insect trachea and endocrine organs from a segmentally repeated precursor*. **Current Biology**. 24, 76-81.

*Sánchez-Higueras, C. and Castelli-Gair Hombría J. (2016). *Precise long-range migration results from short-range stepwise migration during ring gland organogenesis*. **Developmental Biology**. 414:45-57.

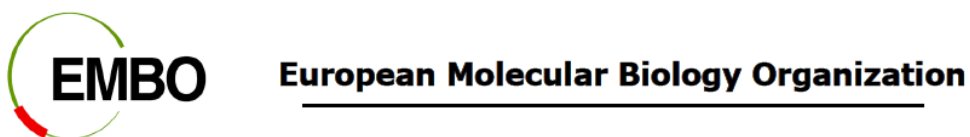
- **Capítulo de libro:**

J. Castelli-Gair Hombría, C. Sánchez-Higueras* and E. Sánchez-Herrero (2016). *Control of organogenesis by Hox genes*. **Springer Editorial**. ISBN: 978-3-319-42765-2



Esta tesis doctoral ha sido realizada en el Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CSIC, UPO, JA), y financiada, por la beca predoctoral FPI con referencia: "BES-2011-043783" asociada al proyecto I+D+I del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad del Gobierno de España con referencia: "BFU2010-15020".

Las estancias de investigación realizadas durante esta tesis doctoral, han sido financiadas por la beca predoctoral FPI (BES-2011-043783), así como por las organizaciones, EMBO (*European Molecular Biology Organization*; Ref: AST 434-2016) y *The Company of Biologists* (Ref: DEVTF160702).



RESUMEN

Durante el crecimiento de los artrópodos, la presencia de un exoesqueleto, obliga al animal a realizar varias mudas. En los insectos las mudas y la metamorfosis están reguladas por la hormona juvenil secretada por el *corpora allata* y la ecdisona secretada por la glándula protorácica. En los dípteros, ambas glándulas están asociadas en un órgano endocrino, la glándula anular. En las últimas décadas se ha estudiado en profundidad la fisiología de la glándula anular, especialmente en *Drosophila melanogaster*, pero se conoce poco sobre su desarrollo.

En esta tesis se describe el origen embrionario del *corpora allata* y la glándula protorácica así como la red genética que controla su especificación en *D.melanogaster*. Así mismo analizamos los principales eventos morfogenéticos que tienen lugar durante el ensamblaje de estas glándulas con el *corpora cardíaca* para la formación de la glándula anular que incluyen una transición epitelio-mesénquima de los precursores y su posterior migración celular colectiva a larga distancia.

Como resultado del estudio del desarrollo embrionario y genético del *corpora allata* y la glándula protorácica, concluimos que existe una relación evolutiva entre estos órganos endocrinos y los órganos respiratorios de los artrópodos en lo que representa un caso extremo de evolución divergente de un órgano.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN (página 1)

1. La Glándula Anular de *Drosophila melanogaster* (página 1)

2. Genes Hox (página 2)

2.1 Generalidades (página 2)

2.2 Regulación de la expresión génica (página 3)

2.3 Regulación de la morfogénesis y organogénesis por genes Hox (página 6)

2.3.1 Control de procesos celulares por genes Hox (página 6)

2.3.2 Represión de organogénesis por genes Hox (página 7)

2.3.3 Activación de organogénesis por genes Hox (página 8)

2.3.4 Regionalización funcional de un órgano (página 10)

3. Migración celular colectiva (página 12)

3.1 Regulación molecular de la movilidad celular (página 12)

3.2 Transición epitelio-mesénquima y migración celular (página 15)

3.3 Otros modelos de migración celular colectiva (página 19)

3.3.1 *Border cells* de *Drosophila melanogaster* (página 19)

3.3.2 Línea lateral de *Danio rerio* (página 22)

3.3.3 Sistema traqueal de *Drosophila melanogaster* (página 24)

3.3.4 Cresta neural de vertebrados (página 26)

SECCIÓN PUBLICACIONES (página 29)

Artículo 1: *Common origin of insect trachea and endocrine organs from a common ectodermal precursor*

Artículo 2: *Precise long-range migration results from short-range stepwise migration during ring gland organogenesis*

Capítulo de libro: *Control of organogenesis by Hox Genes*

RESULTADOS SUPLEMENTARIOS (página 30)

1. Análisis genético del requerimiento de *ventral veinless* en los precursores endocrinos *Drosophila melanogaster* (página 31)

1.1 Requerimiento temporal de *ventral veinless* en los precursores endocrinos de *Drosophila melanogaster* (página 31)

2. Análisis genético y bioquímico de la regulación de los *enhancers vvl 1+2* y *snail-rg* por genes Hox (página 34)

2.1 *Enhancer vvl 1+2* (página 34)

2.1.1 Comprobación de unión directa mediante ChIP (página 34)

2.1.2 Mutagénesis del *enhancer vvl 1+2* (página 36)

2.1.3 Análisis bioquímico del *enhancer vvl 1+2* (página 41)

2.2 *Enhancer snail-rg* (página 43)

2.2.1 Mutagénesis del *enhancer snail-rg* R2P2 (página 46)

2.2.2 Análisis bioquímico del *enhancer snail-rg* R2P2 (página 47)

3. Identificación de nuevos reguladores genéticos del *enhancer snail-rg* (página 50)

3.1 Spalt (página 50)

3.2 Wingless y Hedgehog (página 52)

4. Supresión de la función de *snail* en los primordios del *corpora allata* y la glándula protorácica mediante el sistema CRISPR/Cas9 (página 54)

4.1 Uso del sistema CRISPR/CAS9 para deleccionar *snail-rg* (página 54)

4.2 Análisis del comportamiento de grupos celulares aislados del CA/GP mediante la inducción de letalidad con CRISPR (página 59)

5. Análisis del comportamiento celular del *corpora allata* y la glándula protorácica en embriones silvestres (página 62)

6. Identificación de los precursores endocrinos en embriones de otras especies de artrópodos (página 64)

6.1 Búsqueda de los precursores endocrinos en *Parasteatoda tepidariorum* (página 65)

6.2 Búsqueda de los precursores endocrinos en *Strigamia maritima* (página 67)

Videos suplementarios (página 72)

DISCUSIÓN GENERAL (página 75)

1. Origen embrionario del *corpora allata* y la glándula protorácica (página 75)
2. Regulación genética común y específica de un *enhancer* por genes Hox (página 78)
3. Migración celular colectiva de los precursores de la glándula anular (página 81)

CONCLUSIONES GENERALES (página 84)

MATERIAL Y MÉTODOS SUPLEMENTARIOS (página 86)

- 1 ChIP-PCR de las proteínas Hox Dfd y Abd-B en cultivo de células de *Drosophila melanogaster* (página 87)
2. Mutagénesis dirigida de los *enhancers* *vvl* 1+2 y *snail*-rg (página 93)
3. Regulación genética de los *enhancers* *vvl* 1+2 y *snail*-rg (página 94)
4. Deleción del *enhancer* *snail*-rg mediante tecnología CRISPR (página 94)
5. Generación del minigen *vvl* 1+2-Vvl:eGFP, pCaSpeR-eGFP:Gal4 y el *reporter* *vvl*-auto-mCherry (página 96)
6. Generación de anticuerpo policlonal de *Dm*-Spalt *major* (página 98)
7. Generación de sondas de ARN para protocolo de ARN *in situ* en embriones de *Parasteatoda tepidariorum* y *Strigamia maritima* (página 101)
8. Ensayos de movilidad electroforética (EMSAs; página 101)

BIBLIOGRAFÍA ADICIONAL (página 104)

INTRODUCCIÓN

1. La Glándula Anular de *Drosophila melanogaster*

El crecimiento de los insectos presenta varias fases de vida con morfología diversa y adaptaciones especializadas a distintos ambientes ecológicos. La fase embrionaria está seguida de varias fases de desarrollo larvario libre donde se da la mayor parte del crecimiento. La fase larvaria concluye con un periodo inactivo donde se da la metamorfosis que conduce a la formación del adulto fértil. La progresión entre fases está controlada por hormonas secretadas por tres glándulas endocrinas: la glándula protorácica, el *corpora allata* y el *corpora cardiaca*, que determinan la duración de cada fase del desarrollo. En la larva de *Drosophila melanogaster*, así como en la mayoría de los dípteros, estas tres glándulas están fusionadas formando la glándula anular (figura 1).

La glándula anular se localiza anteriormente al cerebro de la larva asociada a la aorta anterior (Abu-Shaar et al., 1999; King et al., 1966). La glándula protorácica (GP), el componente de mayor tamaño y número de células de la glándula anular, secreta ecdisona a la hemolinfa transportándose a los tejidos diana que la transforman en la forma activa 20-Hidroxiecdisona que induce los principales eventos del desarrollo larvario. La ecdisona es secretada en pulsos que anteceden cada muda larvaria, la pupación y el comienzo de la metamorfosis (Mirth et al., 2005).

El *corpora allata* (CA) secreta la hormona juvenil durante primer y segundo estadio larvario. La coexpresión de 20-Hidroxiecdisona y hormona juvenil induce la muda entre estadios larvarios. Una vez que la larva alcanza un tamaño crítico al comienzo del tercer estadio larvario, la producción de hormona juvenil cesa, permitiendo a la 20-Hidroxiecdisona iniciar los cambios en la expresión génica requeridos para la metamorfosis (Rewitz et al., 2013).

El *corpora cardiaca* (CC; figura 2), se localiza en la base de cada lóbulo de la glándula anular de *Drosophila* (King et al., 1966). Entre otras funciones, las células del *corpora cardiaca* regulan los niveles de glucosa a través de la producción de la hormona adipokinética, equivalente a la hormona glucagón de mamíferos (Kim and Rulifson, 2004).

Aunque la función fisiológica de la glándula anular en la larva de *Drosophila* ha sido extensamente estudiada, el origen embrionario del *corpora allata* y la glándula protorácica era desconocido antes de este trabajo. Únicamente se había caracterizado el origen embrionario del *corpora cardiaca* a partir de un grupo de células del mesodermo cefálico del embrión (De Velasco et al., 2004; Park et al., 2011). Las células precursoras del *corpora cardiaca* se desplazan desde la región anterior del embrión donde se originan, hasta el primer segmento abdominal, donde se integran al final del desarrollo embrionario en la parte ventral de la glándula anular. Así mismo, se sabía que el desarrollo de el CC requiere la función de factores de transcripción como Tinman y Daughterless para especificar los precursores del *corpora cardiaca* en el mesodermo (Park et al., 2011).

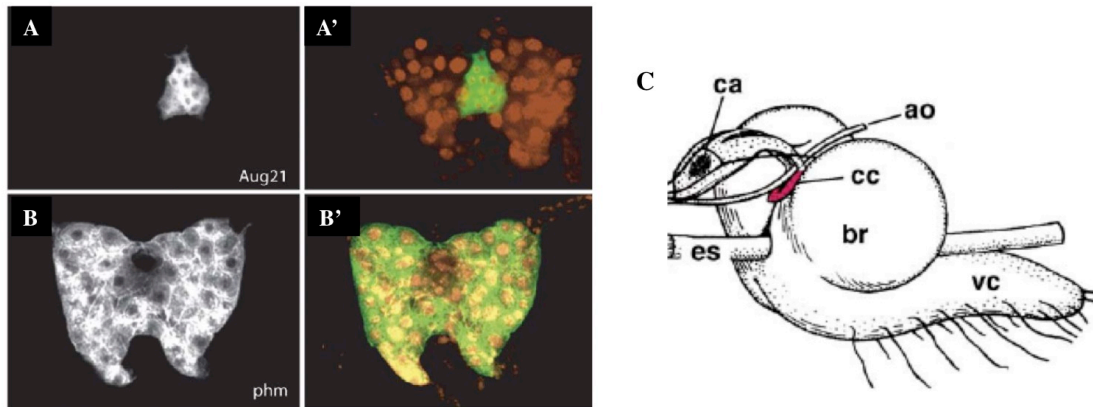


Figura 1. Glándula anular en el tercer estadio larvario de *Drosophila melanogaster*. (A-B) Glándula anular aislada de una larva. (A-A') muestra la localización del *corpora allata* utilizando el marcador específico Aug21-GAL4 dirigiendo la expresión de UAS-GFP de membrana. (A') Se muestran en rojo todos los nucleos de la glándula anular teñidos con Ioduro de Propidio. (B) Marcaje específico de la glándula protorácica con el marcador *phantom*-Gal4 dirigiendo la expresión de UAS-GFP de membrana. (B') Doble tinción *phm*-GAL4>UAS GFP con Ioduro de Propidio. El *corpora cardiaca* no está marcado en estas preparaciones. (C) Esquema de la glándula anular larvaria mostrando su localización respecto a los lóbulos cerebrales (br). El *corpora cardiaca* se destaca en color rojo en la base de la glándula anular y de la aorta (ao) que la atraviesa. (es, esófago; vc, sistema nervioso ventral; ca, *corpora allata*). A-B', adaptado de (Mirth et al., 2005). C, Adaptado de (De Velasco et al., 2004).

2. Genes Hox

2.1 Generalidades

La organización del desarrollo embrionario depende de un número relativamente pequeño de genes reguladores que proporcionan información espacial y temporal a cada célula. Entre estos, destacan los genes Hox, factores de transcripción portadores de homeodominio (HD; Figura 3) que son requeridos para la especificación del eje antero-posterior del cuerpo de todos los animales bilaterales (Lemons and McGinnis, 2006; Pick and Heffer, 2012). Los genes Hox están involucrados en la organogénesis así como en la especificación de diferentes tipos celulares, mostrando un amplio rango de actividades regulatorias a lo largo del desarrollo animal (Hombria and Lovegrove, 2003).

Los genes Hox están clasificados en grupos parálogos surgidos durante la evolución por sucesivos eventos de duplicación (Lemons and McGinnis, 2006) que permitieron la diversificación de los patrones de expresión de los genes Hox y su función. Según su similitud, los genes Hox están clasificados en grupos parálogos anteriores, centrales y posteriores. Tanto en vertebrados como en invertebrados, mutaciones que alteran la expresión espacial de un gen Hox a lo largo del eje antero-posterior del embrión, dan lugar a transformaciones homeóticas, que causan la transformación de una parte del cuerpo en otra diferente debido a la activación de los programas genéticos controlados por el gen Hox en una posición incorrecta. Existen 8 genes Hox parálogos en *Drosophila* (Figura 3) y 39 en mamíferos.

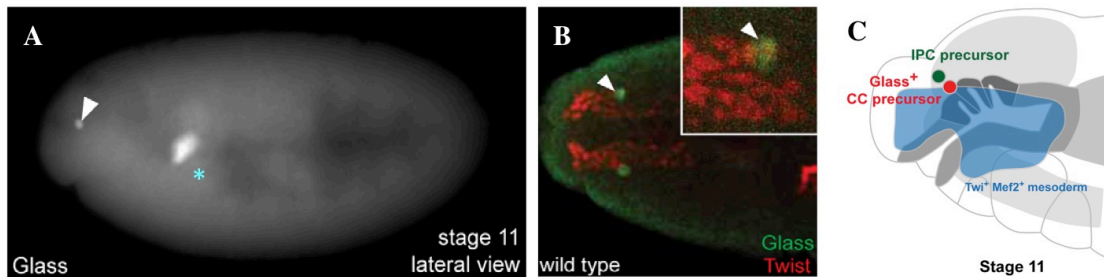


Figura 2. Origen embrionario del corpora cardiaca. (A) Vista lateral de un embrión de *Drosophila* 6 horas después de la fecundación (st11) teñido con Glass. Tanto el primordio del CC (cabeza de flecha) como el órgano de Bolwig (órgano fotoreceptor de la larva, asterisco) expresan Glass. (B) Vista dorsal de un embrión donde se observan los dos primordios contralaterales del CC co-expresando Glass y el marcador general de mesodermo Twist. (C) Vista lateral donde se esquematiza la localización de los precursores mesodérmicos Glass⁺ del CC (círculo rojo; región azul Twi⁺Mef⁺), especificados en un st11. El precursor del CC se localiza en el mesodermo que rodea a la invaginación del intestino anterior (ectodermo; gris oscuro) y próximo a los precursores de las células productoras de insulina (IPC, *insulin producing cells* de origen neuroectodérmico). En todas las figuras anterior está a la izquierda. A-C Adaptado de Park et al; 2011.

2.2 Regulación de la expresión génica

La actividad reguladora de las proteínas Hox se fundamenta en su interacción física con secuencias de ADN *cis*-reguladoras (*cis regulatory element*; CRE) que influyen positivamente, *enhancers*, o negativamente en la transcripción de un gen (Levine, 2010). Las interacciones entre una proteína con un CRE, se basan en la existencia de sitios de unión específicos para esa proteína. Una proteína puede tener actividad represora o activadora sobre la transcripción en función del conjunto de proteínas que recluta (Levine, 2010; Merabet et al., 2005b). En el caso de las proteínas Hox se han descrito interacciones con CRE que resultan en actividades tanto represoras como activadoras de la expresión génica (Merabet and Mann, 2016).

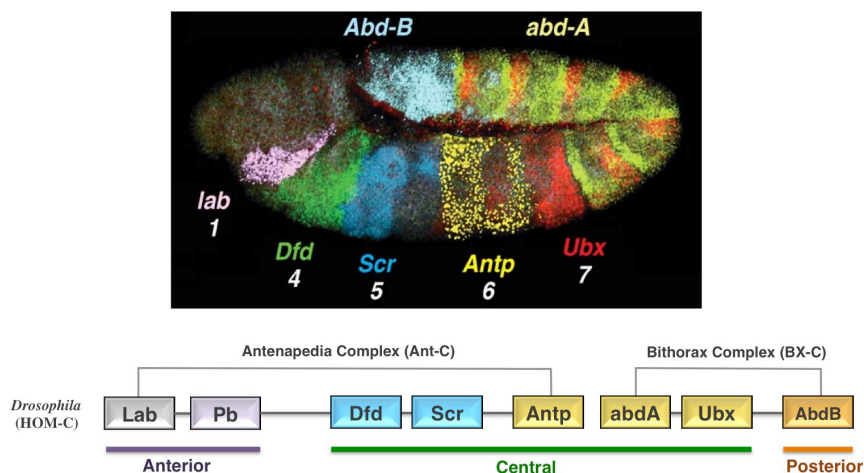


Figura 3. Organización de los genes Hox en *Drosophila melanogaster*. En la parte superior se muestra una imagen obtenida con microscopía confocal de una hibridación de ARN *in situ* séptuple, en un embrión de *Drosophila* (vista lateral; st11). La tinción corresponde a los genes Hox *labial* (*lab*), *Deformed* (*Dfd*), *Sex combs reduced* (*Scr*), *Antennapedia* (*Antp*), *Ultrabithorax* (*Ubx*), *abdominal-A* (*abd-A*) y *Abdominal-B* (*Abd-B*). En la parte inferior se representan los tres grupos parálogos, así como su organización en el genoma de *Drosophila* en dos complejos, el complejo Antennapedia que incluye a los parálogos anteriores y tres centrales (*Dfd*, *Scr*, *Antp*) y el complejo Bithorax que incluye a dos centrales (*Ubx*, *abd-A*) y el posterior. Imagen de hibridación *in situ* adaptada de Lemons&MacGinnis; 2006.

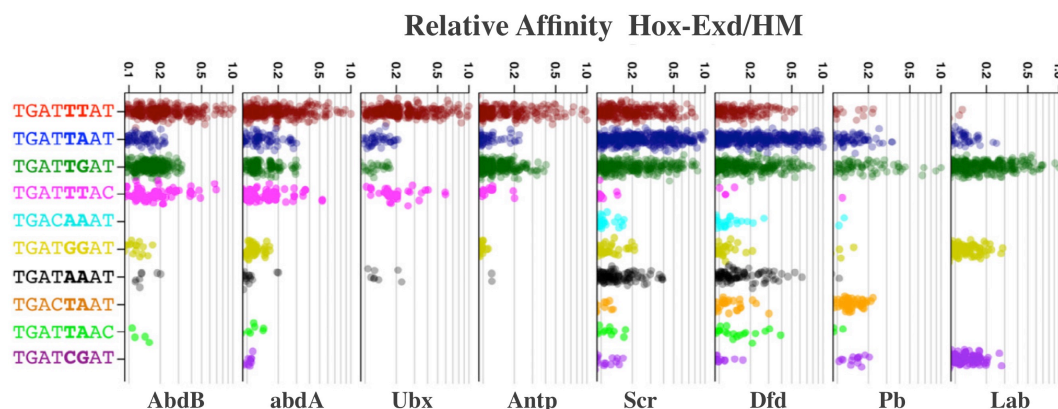


Figura 4. Preferencias de unión al ADN del complejo Hox-Exd de *Drosophila*. Distribución de afinidades de unión al ADN *in vitro* para las 8 proteínas Hox en presencia de Exd, obtenidas por SELEX-seq. Aunque se representan secuencias de **8 pares de bases (pb)**, los datos corresponden a oligonucleótidos de 12 pb de longitud, con un motivo o secuencia central de 6 pb, que determina el código de color.

La estructura general del sitio de unión consenso identificado por SELEX-seq, es la siguiente: [Flanco Exd (3pb)_núcleo (6pb)_Flanco Hox (3pb) = (nTG_AYNNAY_nnn)]. El motivo central interactúa físicamente tanto con Exd como Hox (Y= C o T; N= A, T, G, C). La secuencia central y los flancos, determinarán el grado máximo de afinidad para las proteínas Hox. Por ejemplo, Exd-Lab y Exd-Pb no se unen bien a secuencias centrales rojas, mientras que Exd-Ubx no muestra ninguna afinidad hacia secuencias centrales amarillas. De igual manera, solamente proteínas Hox abdominales (Ubx, abd-A y Abd-B) se unen con alta afinidad a las secuencias magenta. Los genes Hox cefálicos, Dfd y Scr son los menos selectivos ya que pueden interactuar con los diez tipos de motivos centrales. El grado final de afinidad lo determinarán las secuencias flanqueantes. Por ejemplo, la secuencia central roja permite alcanzar el máximo grado de afinidad a proteínas Hox troncales (Antp, Ubx, abd-A, Abd-B) con las secuencias flanqueantes óptimas, pero en caso de que los flancos no sean óptimos, esto puede hacer a dicho sitio de unión ser de baja afinidad.

SELEX-seq utiliza una librería aleatoria de oligonucleótidos (12pb), incubada con el complejo proteico, que es secuencialmente enriquecida en oligonucleótidos de mayor afinidad a través de múltiples rondas de unión, purificación, amplificación, junto con la secuenciación masiva en cada etapa y análisis estadístico-matemático. En este caso las proteínas Hox fueron purificadas y mezcladas con Exd y el dominio HM (Homothorax-Meis) del factor de transcripción Homothorax (Hth). El dominio HM de Hth, es necesario y suficiente para la localización nuclear de Exd, así como para llevar a cabo la mayor parte de las funciones de proteínas Hox dependientes de Hth (Abu-Shaar et al., 1999; Noro et al., 2006). **Figura adaptada de Slattery et al., 2011.**

La regulación de un gen está mediada por uno o varios *CRE* y las proteínas que se unan a ellos. Para una proteína Hox particular, el efecto regulador dependerá del contexto genético, esto es, factores como la expresión en una célula concreta de otros co-reguladores (positivos o negativos), accesibilidad a la cromatina, patrón de expresión temporal, etc (Merabet and Mann, 2016). En esta introducción, nos centraremos en cómo distintas preferencias de unión al ADN pueden ser la base de la regulación génica específica llevada a cabo por las proteínas Hox *in vivo*.

Las proteínas Hox, se unen al ADN a través del homeodominio (HD; Figura 5), el homeodominio es una secuencia de 60 a.a. altamente conservada, particularmente en aminoácidos que contactan directamente con el ADN. Constituyen una excepción los homeodominios presentes en factores de transcripción TALE (*Three amino acid loop extension*) los cuales contienen tres aminoácidos adicionales entre las hélices 1 y 2 que proporcionan un “bolsillo” de unión para los motivos W de proteínas Hox (figura 5).

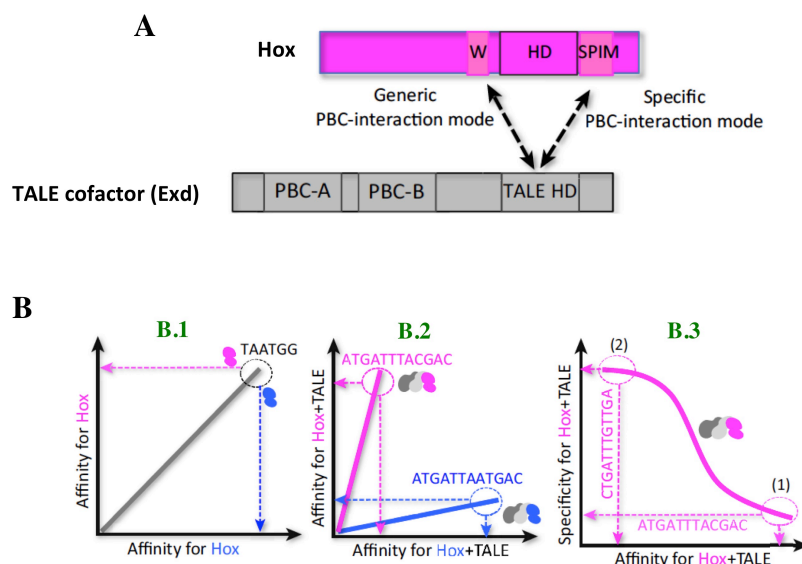


Figura 5. Relación entre afinidad y especificidad de unión al ADN por proteínas Hox. (A) Se esquematizan los dominios principales de una proteína Hox y sus cofactores tipo TALE. (B) Se ilustra cómo la interacción con Exd (cofactor TALE) diversifica la afinidad de diferentes proteínas Hox (distintos parálogos destacados en azul y magenta) por una misma secuencia de ADN. (B.1) En ausencia de factor TALE, diferentes parálogos se unen con una preferencia similar a la misma secuencia. (B.2) En presencia de cofactor TALE, diferentes parálogos exhiben diferente afinidad por la misma secuencia. (B.3) Ilustra el equilibrio entre afinidad y especificidad. Un sitio de unión con elevada afinidad no será específico para una determinada proteína Hox (por ejemplo parálogos centrales respecto posterior) pues otras proteínas Hox también tendrán preferencia por dicha secuencia (1). Únicamente secuencias en un rango de baja afinidad de unión serán específicas (2). Es destacable el hecho de que el número de secuencias de muy baja afinidad es mucho más elevado que las de elevada afinidad (figura 4). Esto sugeriría que en la naturaleza existe un amplio rango de elección para alcanzar la especificidad reguladora. **Figura adaptada de Merabet&Mann., 2016.**

Los motivos W son péptidos cortos que contienen triptófano, localizados N-terminal respecto al HD y, que interacciona con el homeodominio del cofactor tipo TALE y con los motivos SPIM (*Specific PBC interaction motif*).

In vitro, los homeodominios de parálogos anteriores y centrales unen secuencias que contienen un motivo TAAT, mientras que parálogos posteriores se unen preferentemente a TTAT (Merabet and Mann, 2016). La capacidad de varios parálogos distintos de unir *in vitro* la misma secuencia de ADN, contrasta con la regulación altamente específica que las diferentes proteínas Hox presentan *in vivo*, generándose la denominada, paradoja de especificidad Hox. Se ha propuesto que esta paradoja puede ser resuelta en base a distintas preferencias de unión al ADN entre las diferentes proteínas Hox (figuras 4 y 5), cuando están en complejo con su principal cofactor, *Extradenticle* (Chan et al., 1994; Slattery et al., 2011). De tal manera que diferencias en la secuencia de aminoácidos presentes en factores de transcripción de la misma familia estructural, tienen un impacto en la especificidad de unión al ADN únicamente cuando están en complejo con sus cofactores. Este hecho ha sido denominado, especificidad latente (Slattery et al., 2011). La mayor aportación en este sentido proviene de estudios bioquímicos y bioinformáticos, mediante la técnica SELEX-seq (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment-sequencing*) sobre las 8 proteínas Hox de *Drosophila* (figura 4).

La técnica SELEX-seq ha permitido identificar *in vitro*, diferentes preferencias de unión al ADN por las proteínas Hox en complejo con Exd (Figuras 4 y 5). Así, se han establecido 10 motivos de secuencia (8 pares de bases) por los cuales los parálogos anteriores, centrales y posterior presentan diferente afinidad de unión (figura 4). Así pues, un *CRE* podría ser regulado *in vivo*, en base a la presencia de sitios de unión, Hox-Exd, que permitan a una determinada proteína Hox interaccionar de manera estable con dicho elemento *cis*-regulador pero no a otra, conllevando esto en última instancia, la formación de un determinado órgano en una posición del cuerpo y no en otra en función de dónde el gen Hox se expresa. Actualmente, son pocos los estudios *in vivo* donde se han caracterizado genéticamente *CREs* que porten los sitios consenso de unión establecidos *in vitro* (Merabet and Mann, 2016; Slattery et al., 2011).

Sorprendentemente, un estudio reciente en *Drosophila* mostró que la regulación específica del *enhancer shavenbaby (svb)* por las proteínas Ubx y Abd-A, se basa en la acumulación de sitios de unión Hox-Exd de muy baja afinidad. Estos sitios no se ajustan al consenso SELEX-seq presentando una afinidad menor del 5% respecto al sitio de unión con la máxima afinidad relativa para Ubx y Abd-A analizado. Mutaciones en estos sitios que incrementan la afinidad para otras proteínas Hox expanden la activación del *enhancer svb* a otros segmentos del embrión donde se expresan proteínas Hox diferentes. Estas observaciones establecen la idea de que la presencia de sitios de baja afinidad de unión pero con elevada especificidad (el resto de proteínas Hox no interaccionan con dichos sitios de unión; Figura 5) es otro mecanismo de regulación génica que también contribuye a resolver la paradoja Hox de especificidad (Crocker et al., 2015).

2.3 Regulación de la morfogénesis y organogénesis por genes Hox

En las últimas décadas se han caracterizado múltiples ejemplos de procesos morfogénicos regulados por genes Hox. Los genes Hox controlan de varias maneras la diversidad morfológica de los animales. Un mecanismo para regular la morfología, es la inducción o represión de órganos en lugares concretos. Otro modo es, el control localizado de procesos celulares tales como la proliferación o la apoptosis.

2.3.1 Control de procesos celulares por genes Hox

La apoptosis celular contribuye a la generación de la morfología final de diversas estructuras como es el caso de la formación de los dedos en las extremidades durante la embriogénesis de vertebrados (Hurle et al., 1996). La inducción de la apoptosis en *Drosophila* está controlada principalmente por los genes, *reaper (rpr)*, *head involution defective (hid)* y *grim*. La eliminación de *rpr*, *hid* y *grim* con la deficiencia *Df(3L) H99*, suprime en gran medida la apoptosis celular y los embriones mueren prematuramente con un número incrementado de células (White et al., 1994). La regulación de la expresión de *reaper* por *Deformed*, ejemplifica cómo los genes Hox controlan directamente procesos celulares para modificar la morfología de estructuras embrionarias.

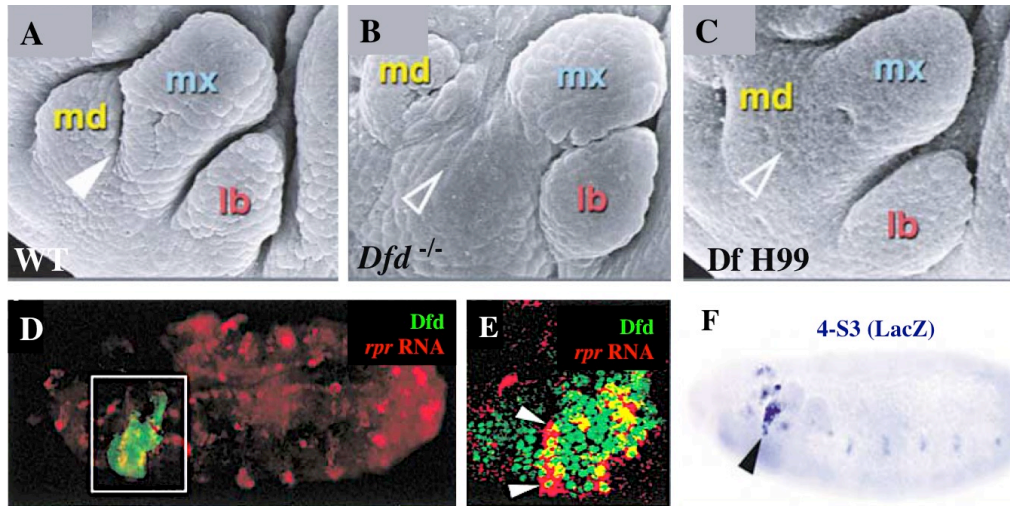


Figura 6. Regulación de la apoptosis por genes Hox. (A-C). Imágenes de microscopía electrónica de barrido. (A) Embrión silvestre donde se muestran tres segmentos cefálicos: mandíbula (md), maxila (mx) y labio (lb). La cabeza de flecha señala el surco que separa los segmentos mandibular y maxilar. (B) En un mutante *Dfd* no se forma el surco que limita al segmento mandibular del maxilar (cabeza de flecha). (C) La eliminación de *rpr*, *hid* y *grim*, a través de la *Df*(3L) H99, también supone la falta de formación del surco entre maxila y mandíbula (cabeza de flecha). (D) Expresión de *rpr* (rojo) y *Dfd* (verde). En la ampliación (E) se puede observar la coexpresión de *Dfd* y *reaper* en la zona que formará el surco segmental entre maxila y mandíbula. (F) Patrón de expresión del *enhancer* 4-S3 de *rpr* que dirige la expresión de LacZ principalmente en el límite entre mandíbula y maxila. **Figura adaptada de Lohmann et al., 2002.**

Deformed, se expresa en el segmento maxilar, y mandibular donde induce la formación de estructuras cefálicas. Adicionalmente *Dfd* contribuye a establecer el límite físico entre estos segmentos regulando la apoptosis celular. Tanto la pérdida de expresión de *Dfd* como de inductores apoptóticos, conduce a una fusión entre segmentos (Lohmann et al., 2002). *Dfd* induce la apoptosis para la formación del surco intersegmental, a través de la regulación directa no dependiente de Exd/Hth, del *enhancer* 4-S3 de *reaper* (Figura 6). La expresión ectópica de *Dfd* en el tronco es suficiente para inducir la muerte celular a lo largo del embrión, así como la activación ectópica del *enhancer* 4-S3. Así mismo, la expresión ectópica mediante el sistema Gal4/UAS del inductor de apoptosis, *reaper*, en la zona intersegmental de mutantes *Dfd* es suficiente para rescatar la formación del surco entre mandíbula y maxila (Lohmann et al., 2002). Este caso ilustra cómo los genes Hox modifican el desarrollo controlando directamente un proceso celular.

2.3.2 Represión de organogénesis por genes Hox

Una manera de restringir el desarrollo de un órgano a una localización del cuerpo es reprimiendo la expresión de genes esenciales para el desarrollo del mismo. Un ejemplo representativo de este proceso es la represión por Ubx, Abd-A y Abd-B de la expresión del gen *Distalless* (*Dll*) involucrado en la especificación de patas; restringiendo de esta manera, la formación de las patas a los segmentos torácicos.

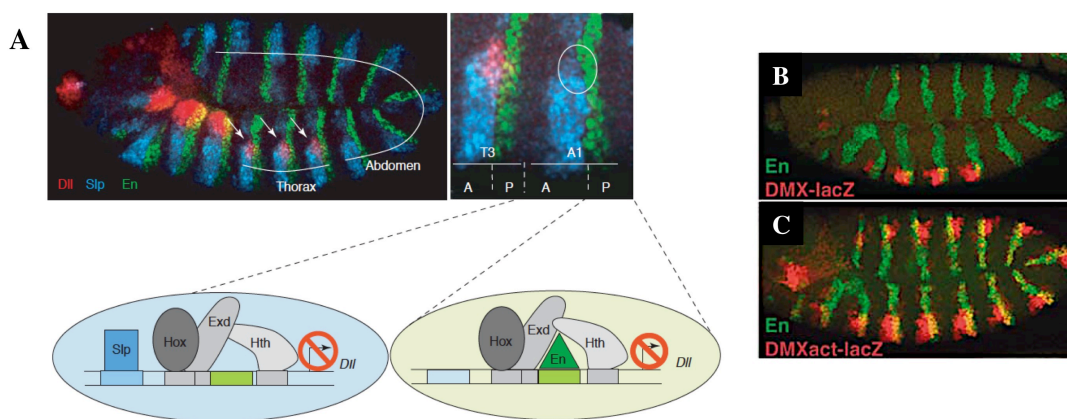


Figura 7. Represión transcripcional de *Distalless* por genes *Hox*. (A) Expresión de *Dll* (rojo) en el embrión de *Drosophila* (st11; vista lateral), indicándose su expresión en el primordio de pata (flechas blancas). También se muestra la expresión de Slp y En. En la imagen ampliada del tercer segmento torácico (T3) y primero abdominal (A1) del embrión, se observa la expresión de Slp y En en el compartimento anterior y posterior de cada segmento respectivamente. En distintas células Slp o En interactúan con Ubx, Abd-A y Abd-B para reprimir la expresión de *Dll* en el abdomen. (B) Patrón de expresión silvestre de Engrailed y del *enhancer* DMX de *Dll*, que dirige la expresión de LacZ en el tórax. (C) Una versión de DMX mutada en los sitios de unión a Ubx, Abd-A y Abd-B conduce a una activación ectópica del *enhancer* en el abdomen. **A; Imagen adaptada de (Merabet et al., 2005b). B-C; Imagen adaptada de (Gebelein et al., 2004).**

Embriones mutantes para *Ubx*, *abd-A* y *Abd-B* presentan una activación de *Dll* en los segmentos abdominales (Figura 7C). Así mismo la expresión ectópica de Ubx, Abd-A y Abd-B en el tronco reprime la activación de *Dll* y la formación de patas en los segmentos torácicos.

El *enhancer* DMX (figura 7) que regula la expresión de *Dll* en los primordios de las patas, interacciona directamente con Ubx, Abd-A y Abd-B (Gebelein et al., 2004). Ubx, Abd-A se unen al sitio de unión en el *enhancer* de *Dll* en complejo con Exd/Hth y lo reprimen. La represión requiere también la unión directa de las proteínas de segmentación Engrailed (En) y Sloppy paired (Slp) como co-reguladores (Figura 7). Abd-B no requiere a los cofactores Exd/Hth para unirse a este mismo sitio (Sambrani et al., 2013).

2.3.3 Activación de organogénesis por genes *Hox*

Los genes *Hox* pueden iniciar complejas cascadas genéticas mediante la activación simultánea de un conjunto reducido de genes primarios que a su vez activarán una compleja red de genes involucrados directamente en procesos celulares, denominados "genes realizadores" (García-Bellido, 1975). La formación del espiráculo posterior en *Drosophila* inducida por el gen *Hox*, *Abd-B*, ejemplifica esta situación.

Los espiráculos posteriores son estructuras respiratorias que conectan la red tubular traqueal con el medio exterior. Los espiráculos posteriores se subdividen en dos partes: la cámara espiracular interna, un tubo con funciones filtradoras que conecta con la tráquea; y el estigmatóforo, una estructura externa que aloja a la cámara espiracular (Hu and Castelli-Gair, 1999).

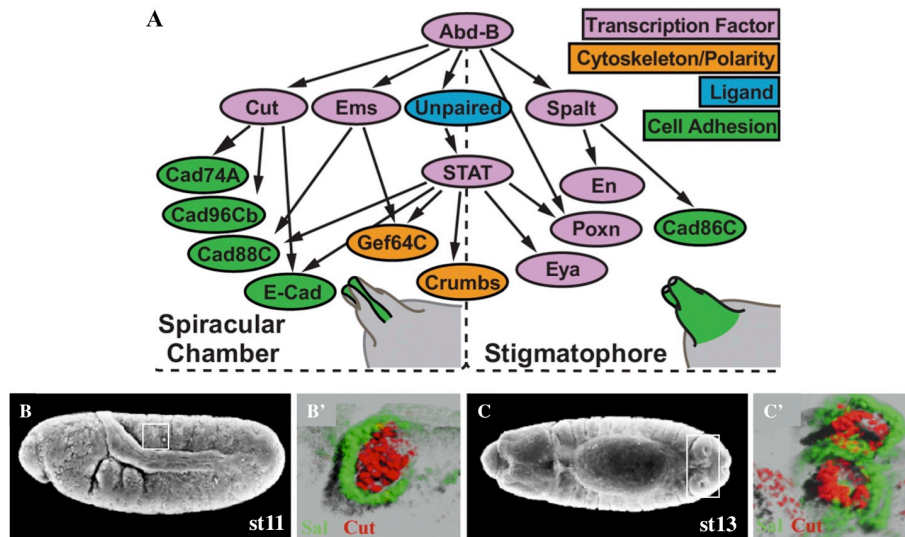


Figura 8. Activación de la cascada genética que da lugar al espiráculo posterior de *Drosophila melanogaster*. (A) interacciones genéticas activadas por Abd-B para inducir la formación de los espiráculos posteriores en el octavo segmento abdominal (A8). Abd-B en conjunción con señales intrasegmentales activa la expresión de factores de transcripción (*sal*, *cut*, *ems*, *poxn*; magenta) y moléculas de señalización (*upd*; azul) en el primordio del espiráculo posterior. Dichos genes primarios activados por Abd-B, inducen directa o indirectamente la expresión de proteínas involucradas directamente en procesos celulares, como moléculas de adhesión (verde), polaridad celular y reguladores del citoesqueleto (naranja) así como a otros factores de transcripción secundarios, dando lugar a los comportamientos celulares que dirigen la formación del espiráculo (Lovegrove et al; 2006). *poxn*, es activado por Abd-B y la vía de señalización JAK/STAT conjuntamente. (B) Imagen de microscopía electrónica de barrido (MEB) de un embrión de *Drosophila* (vista lateral; st11). El recuadro destaca la localización del primordio del espiráculo en A8. (B') Detalle del primordio del espiráculo mostrando la expresión de *Sal* en el futuro estigmatóforo (verde) y *Cut* en la cámara espiracular (rojo). (C) Imagen dorsal de un embrión de *Drosophila* obtenida por MEB (st13), indicándose la localización de los dos espiráculos contralaterales. (C') Detalle de la cámara espiracular (rojo; *Cut*) y el estigmatóforo (verde; *Sal*) en un st13. A, adaptado de (Glassford et al., 2015). B-C', adaptado de (Merabet et al., 2005a).

Abd-B induce la formación del espiráculo posterior activando a sus genes diana primarios en el ectodermo dorsal del octavo segmento abdominal (figura 8). A continuación, los genes diana primarios, que en su mayoría son factores de transcripción, activarán un conjunto de genes involucrados en procesos de adhesión celular, modificación del citoesqueleto y polaridad celular (realizadores) tanto en la cámara espiracular como en el estigmatóforo y cuya actividad desencadenará la morfogénesis del espiráculo. La expresión ectópica de Abd-B a lo largo del ectodermo embrionario desencadena la formación de espiráculos ectópicos. Incluso, la expresión ectópica simultánea de las dianas primarias de Abd-B, en el ectodermo de mutantes *Abd-B*, puede inducir la formación de estructuras tubulares que expresan algunos de los genes realizadores de la red genética espiracular (Lovegrove et al., 2006).

Cabe destacar, que la cascada organogénica del espiráculo inducida por Abd-B en el embrión de *Drosophila*, es co-optada para formar el lóbulo posterior de la genitalia en machos, una estructura evolutivamente más reciente que el espiráculo (Glassford et al., 2015), ilustrando como reguladores genéticos de la organogénesis, como los genes Hox, pueden activar las mismas redes génicas pre-existentes para inducir un nuevo órgano o nueva estructura en otra etapa del desarrollo animal.

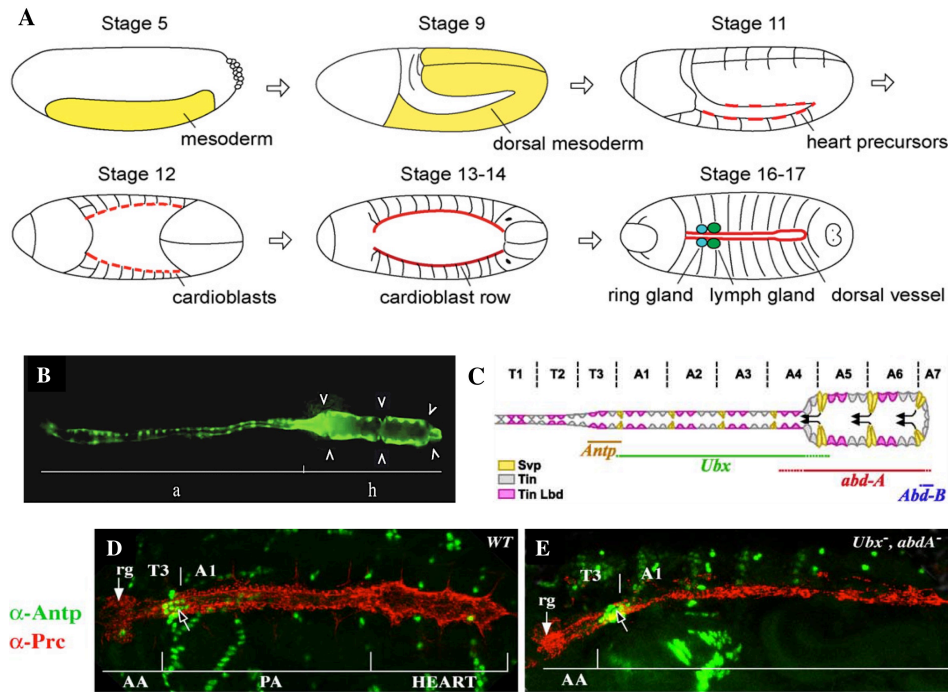


Figura 9. Regionalización funcional de un órgano por genes Hox. (A) Muestra el origen embrionario del mesodermo cardíaco, el cual es especificado a partir de un estadio embrionario 11. Los estadios 5-11, corresponden a visiones laterales. Los estadios 12-17 corresponden a visiones dorsales. Anterior siempre se sitúa a la izquierda. (B) Vista dorsal del corazón (h) y aorta (a) de un embrión tardío de *Drosophila* (st16) que expresa el marcador Toll-nGFP en los cardiomiocitos. Corazón y aorta (tubo cardíaco), morfológicamente diferentes, forman un tubo dorsal desde el primer segmento torácico (T1) hasta el séptimo abdominal (A7). La aorta se subdivide en aorta anterior (AA; T1-T3) y aorta posterior (PA; A1-A4). El corazón abarca los segmentos A5-A7 y tienen una estructura en forma de cámara con mayor lumen. Se indican con flechas las células valvulares del corazón (*ostiae*). (C) Se representan los dominios de expresión de los genes Hox en el tubo cardíaco. *Abd-B* y *abd-A* se expresan en el corazón. *Ubx* en la aorta posterior y *Antp* en T3-A1. La aorta anterior no expresa genes Hox en T1-T2, donde se asocian la glándula linfática y la glándula anular. Se destaca además la expresión de varios marcadores en los cardiomiocitos de la aorta y corazón, Seven up (Svp), Tinman (Tin) y Ladybird (Lbe). (D) Vista dorsal de un embrión silvestre (st16) con el sistema vascular completamente formado. La tinción con Pericardina (Prc, rojo), marca las células pericárdicas de la aorta y el corazón, así como la glándula anular (rg; *ring gland*). *Antp* (verde) es expresado en la parte posterior de T3 y el primer par de cardiomiocitos de A1. El tubo cardíaco tiene una subdivisión morfológica y funcional (AA, PA y Corazón). (E) El doble mutante *Ubx abd-A*, muestra la transformación de la aorta posterior y el corazón hacia aorta anterior. Se observa la pérdida de las características morfológicas del corazón. Destaca también que la expresión de *Antp* no se expande posteriormente. (A) Imagen adaptada de Tao&Schulz; 2007. (B-D) Adaptada de Perrin et al; 2004.

2.3.4 Regionalización funcional de un órgano

Los genes Hox pueden regular también la regionalización de un órgano especificando diferentes tipos celulares en órganos que han iniciado su organogénesis independientemente de genes Hox. El sistema vascular de *Drosophila* ejemplifica esta situación.

Los insectos poseen un sistema circulatorio abierto. El sistema cardiovascular larvario de *Drosophila* es muy simple. Consta de una estructura tubular subdividida en tres partes: aorta anterior, aorta posterior y corazón (Figura 9). El corazón tiene un lumen mas ancho con una estructura en forma de cámara cerrada posteriormente. La hemolinfa penetra al corazón a través de válvulas segmentales formadas por células especializadas. La contracción cardiaca impulsa la hemolinfa hacia la aorta, de donde sale a la cavidad general del cuerpo por la apertura de la aorta anterior a nivel del primer segmento torácico. Se denomina tubo cardiaco a la aorta y el corazón conjuntamente.

El tubo cardiaco se forma de las células dorsales del mesodermo embrionario que reciben los ligandos *wingless* y *decapentaplegic* producidos por el ectodermo, dando lugar a las células cardiacas y pericárdicas así como la glándula linfática (Tao and Schulz, 2007).

Las células del mesodermo cardiaco forman dos filas contralaterales que se desplazan siguiendo el cierre dorsal del ectodermo hasta fusionarse en la línea media dorsal formando el lumen del tubo cardiaco (figura 9). El mesodermo cardiaco se forma independientemente de los genes Hox, sin embargo *Antp*, *Ubx*, *abd-A* y *Abd-B* se requieren para la especificación de diferentes tipos celulares en sus dominios de expresión a lo largo del tubo cardiaco. En embriones mutantes para *Antp*, *Ubx*, *abd-A* y *Abd-B*, el mesodermo cardiaco completa su morfogénesis básica formando una estructura tubular que, sin embargo, carece de las características funcionales y estructurales así como los distintos tipos celulares que constituyen el tubo cardiaco normal (Perrin et al., 2004). Los genes Hox cefálicos, *lab*, *Dfd* y *Scr* no se expresan en el tubo cardiaco (Perrin et al., 2004).

Ubx y *abd-A*, se expresan en la aorta posterior y el corazón. En dobles mutantes *Ubx abd-A*, la aorta posterior y el corazón se transforman hacia aorta anterior sin que exista una expansión posterior de la expresión de *Antp* (Figura 9). Así mismo, la expresión ectópica de *Antp*, *Ubx* o *abd-A*, transforma la aorta anterior, en aorta posterior-corazón, existiendo una expansión anterior de tipos celulares específicos del tubo cardiaco posterior junto con la eliminación de la glándula linfática (Perrin et al., 2004). No obstante, la función en la diferenciación celular llevada a cabo por *Antp*, *Ubx* o *abd-A* no es exactamente la misma. Por ejemplo, sólo *abd-A* puede activar la expresión en el corazón del gen *ndae1* involucrado en la homeostasis iónica. Este gen se activa en la aorta únicamente a través de la expresión ectópica de *abd-A*. La expresión ectópica en el tubo cardiaco de *Ubx*, reduce los niveles de *ndae1* sin afectar la expresión de *abd-A*, sugiriendo una actividad represora de *Ubx* (Perrin et al., 2004). Conjuntamente, estos resultados ilustran un caso en el que un órgano ya formado, requiere la actividad de diferentes genes Hox para adquirir su funcionalidad.

3. Migración celular colectiva

La migración celular colectiva consiste en la migración coordinada de múltiples células. Se ha propuesto que la migración colectiva incrementaría la eficacia de la migración respecto a células individuales debido a una respuesta coordinada y más eficiente al ambiente tisular (Mayor and Etienne-Manneville, 2016).

Existen diferentes modelos para el estudio de la migración colectiva como las *border cells* de *Drosophila* o la línea lateral de pez zebra, donde las células migradoras se desplazan en grupos compactos en los que el establecimiento de contactos estables célula-célula contribuye tanto al mantenimiento de la cohesividad como a la coordinación del movimiento colectivo. En contraste, existen poblaciones de células como la cresta neural de vertebrados, que no migran como un grupo compacto de células, estableciendo únicamente contactos celulares transitorios y donde la cohesividad del grupo es mantenida por quimiotaxis o producción de ligandos difusibles (Mayor and Etienne-Manneville, 2016; Montell et al., 2012).

3.1 Regulación molecular de la movilidad celular

Los mecanismos moleculares subyacentes a la migración celular, se han estudiado extensamente en cultivo celular (Montell et al., 2012; Vicente-Manzanares et al., 2005), siendo la regulación de la dinámica de la actina del citoesqueleto uno de los pilares moleculares que confieren movilidad a las células.

La migración de una célula conlleva su polarización a lo largo de un eje frontal-posterior conforme al cual se producirán reordenamientos diferenciales del citoesqueleto así como un tráfico intracelular polarizado.

Las proteínas pertenecientes a la familia de Rho-GTPasas, tienen una función reguladora central en la dinámica de polimerización de actina, activación de la miosina y la adhesividad con la matriz extracelular. En células cultivadas, la activación de las GTPasas Rac, Rho y Cdc42 (figura 10; tabla 1), resulta en una reorganización del citoesqueleto que conduce a la formación de diferentes proyecciones de membrana como lamelipodios, fibras de estrés y filopodios, respectivamente (Matozaki et al., 2000; Montell et al., 2012).

En el frente de migración, RAC y CDC42 inducen reordenamientos del citoesqueleto por la rápida polimerización de actina que genera proyecciones de membrana como lamelipodios y filopodios, los cuales se anclan a la matriz extracelular a través de integrinas (tabla 1). En la parte posterior Rho promueve la contracción actina-miosina (figura 10) y la retracción de la parte posterior de la célula hacia el frente, promoviendo el desplazamiento de la célula (Ridley, 2001).

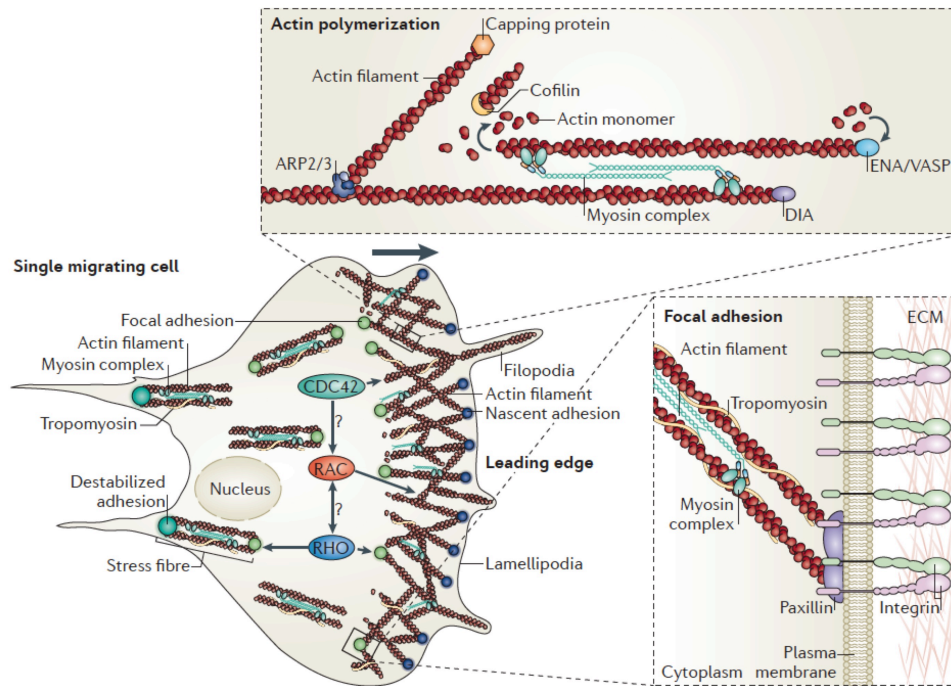


Figura 10. Mecanismos moleculares implicados en la migración celular. Regulación de la polimerización de actina: la actina globular monomérica, es polimerizada sobre fragmentos preexistentes de actina filamentososa (F-actina) incrementando su longitud. Diferentes reguladores están involucrados en el alargamiento-acortamiento de estos filamentos. Las forminas (tabla 1), tales como *Diaphanus* (DIA), inducen la polimerización constituyendo factores limitantes de este proceso. Miosinas, tropomiosina y otras proteínas de unión a filamentos de actina, los estabilizan y previenen su depolimerización por factores como la cofilina. A lo largo de filamentos de actina existentes, el complejo ARP2/3 (*actin related protein*), actúa como factor nucleador para la ramificación de un filamento de actina. Esta ramificación permite la formación de amplias y dinámicas proyecciones de membrana (lamelipodios) que promueven la migración celular, particularmente en superficies planas.

Por otro lado, se encuentran los filamentos de actina en las fibras de estrés (tabla 1) con un alto contenido de miosina y asociados a moléculas de adhesión. El desplazamiento de la miosina a lo largo de las fibras de estrés, contrae la parte posterior de la célula hacia la nueva adhesión generada en la parte frontal. **Las adhesiones focales**, están constituidas por el ensamblaje macromolecular de proteínas adaptadoras como la paxilina, que conecta los filamentos de actina con la matriz extracelular a través de integrinas. Estas adhesiones sirven como anclaje y plataformas de señalización bioquímica, siendo el control de su dinámica fundamental para el desplazamiento celular a través de la matriz extracelular. Esta reorganización del citoesqueleto, tiene su origen en señales generadas en la membrana celular, que son convertidas en movimiento a través de la actividad local de proteínas de la familia Rho GTPasa (tabla 1), que son los reguladores *upstream* de cascadas de señalización que resultarán en la activación de los procesos de reorganización de la actina descritos. En fibroblastos, se ha comprobado que Cdc42 activo promueve la formación de filopodios, mientras que Rac promueve principalmente la formación de lamelipodios. (**Figura Adaptada de Montell et al; 2012**).

Destacar que los mecanismos descritos son muy genéricos. Existe un significativo entrecruzamiento entre GTPasas, esto es, regulación del mismo proceso de manera cooperativa o antagónica (Kim et al., 2004; Matozaki et al., 2000), así como una modulación diferencial de su actividad dependiente del tipo celular, y otros procesos regulados por las mismas.

TABLA 1

1. **Matriz Extracelular:** Conjunto de materiales extracelulares que forman parte de un tejido, en su mayor parte secretados por uno o varios tipos celulares del entorno tisular. Los componentes más básicos son: Proteínas fibrosas divididas en tres tipos, fibras de colágeno, reticulares y elásticas. En la matriz extracelular también hay glicoproteínas adhesivas, como la fibronectina y la laminina. El tipo de matriz extracelular puede variar de un tejido a otro. En base, a su composición bioquímica y modificación por el entorno celular, puede constituir un sustrato de migración específico para un determinado tipo celular.
2. **Integrinas:** Familia de Glicoproteínas transmembrana involucradas en la interacción entre células y la matriz extracelular. Las subunidades α y β de las Integrinas forman heterodímeros, que interactúan con la matriz extracelular, activándose un proceso de señalización intracelular. La conformación de las integrinas y su afinidad por la matriz extracelular viene determinada por factores intracelulares.
3. **Filopodios:** Proyecciones de membrana (hasta $5\mu\text{m}$ de diámetro) formadas por filamentos de actina organizados en haces mediante proteínas de unión a actina. Son inducidos particularmente por la GTPasa CDC42.
4. **Lamelipodios:** Prolongaciones anchas y laminares de la membrana producidos transitoriamente por la polimerización microfilamentos de actina. Son inducidos principalmente por la GTPasa RAC.
5. **Fibras de estrés:** Haces contráctiles de filamentos de actina, anclados a la matriz extracelular mediante adhesiones focales.
6. **Rho-GTPasas:** Familia de pequeñas GTPasas (~ 21 kDa), pertenientes a la superfamilia Ras. Rho, CDC42 y Rac son miembros de esta familia. Están implicadas en la regulación de diversos eventos celulares incluyendo la modificación del citoesqueleto de actina. Las GTPasas son enzimas que unen e hidrolizan GTP. Cuando están unidas a GTP se encuentran en conformación activa, siendo capaces de interactuar con efectores. Unidas a GDP se encuentran en conformación inactiva. Existen a su vez reguladores del estado activo-inactivo de las GTPasas. Las proteínas GAP, favorecen la capacidad intrínseca de hidrólisis de la GTPasa, convirtiéndola en su forma inactiva. Las proteínas GEFs causan la disociación del GDP de la GTPasa, permitiendo que la GTPasa una GTP y se active de nuevo.
7. **Actina:** Familia de proteínas globulares que polimerizan formando microfilamentos. Componente esencial del citoesqueleto celular.
8. **Miosina:** Proteína fibrosa de 1.5 micras de longitud, implicada en división celular, transporte vesicular, así como la migración celular a través de su interacción con los filamentos de actina.
9. **Forminas:** grupo de proteínas de unión a actina que están involucradas en la inducción de la polimerización de los filamentos de actina.

En la migración celular colectiva, existe un nivel adicional de complejidad debido a la existencia de los contactos entre el grupo de células migradoras (Figura 11). Generalmente, existen una o varias células guía o líder que llevan a cabo una migración activa en el frente de migración, mientras que el resto de células son seguidoras. Las células líder presentan una elevada capacidad de reorganización de su citoesqueleto, como aquel descrito durante la migración de células individuales (Figura 10), y son capaces de detectar las señales extracelulares que determinan la direccionalidad de la migración (figura 11). La cohesividad del grupo se debe principalmente a uniones célula-célula (tabla 2), mediadas por cadherinas, integrinas u otros miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Friedl and Gilmour, 2009). Destacar que las uniones homofílicas, cad-cad, presentan la ventaja de que pueden ser rápidamente remodeladas, reduciendo o incrementando la adhesividad entre las células (véase apartado 3.3).

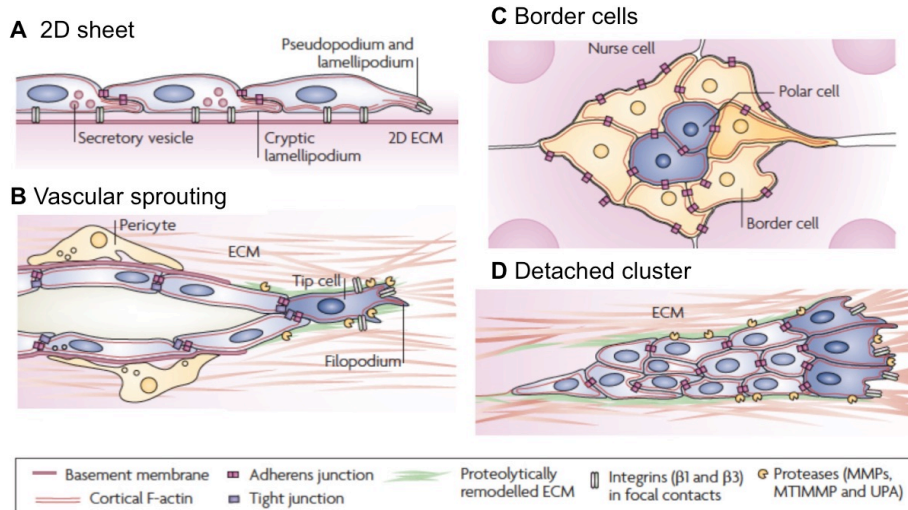


Figura 11. Variantes de migración celular colectiva. Ejemplos representativos de grupos de células que migran colectivamente mostrando las relaciones entre las células, su morfología y relación con la matriz extracelular. (A) Monocapa de células epidérmicas migrando sobre una matriz extracelular bidimensional. Proyecciones de membrana ricas en actina, como lamelipodios, conducen la migración del grupo interconectado a través de uniones adherentes. (B) Generación de una estructura tubular, durante la tubulogénesis vascular, formada por células endoteliales en la que una célula líder con una elevada formación de filopodios conduce la migración sobre una matriz extracelular depositada por pericitos y las propias células endoteliales. La matriz es modificada por proteasas extracelulares secretadas por las células endoteliales, creando un sustrato de migración específico. Las células mantienen la cohesión a través de uniones adherentes y ocluyentes (tabla 2). (C) *Border cells* de *Drosophila melanogaster*, migrando como un grupo de células externas móviles transportando dos internas con menor movilidad, utilizando como sustrato a las células circundantes a las cuales se unen por uniones mediadas por E-cad, la cual también contribuye a la adhesividad del grupo. (D) Representación de células tumorales que se han desprendido del tejido original y migran como un grupo compacto. En muchas secciones histopatológicas, la mayoría de cánceres de origen epitelial, muestran características de invasividad colectiva en el estroma de los tejidos circundantes, como la expresión de E-cadherina, y otros receptores implicados en adhesividad celular. Tipos de cáncer como rhabdomyosarcoma, carcinoma colorrectal, melanoma, etc, muestran capacidad de movilidad e invasión colectiva cuando son explantados *in vitro*. (Figura adaptada de Friedel & Gilmour, 2009).

3.2 Transición epitelio-mesénquima y migración celular

Los epitelios se caracterizan por tener elevados niveles de E-cadherina que contribuyen a unir las células vecinas a través de uniones adherentes, manteniendo su integridad y cohesividad. Por ello, un proceso fundamental previo al inicio de la migración celular epitelial es la pérdida de conectividad de las células migradoras con el epitelio adyacente. Esto se caracteriza, genéricamente, por la pérdida de características epiteliales típicas como la polaridad apico-basal (tabla 2), la represión transcripcional de la E-cadherina y la redistribución de la E-cadherina ya existente, causando una transición epitelio a mesénquima (Campbell and Casanova, 2016; Schafer et al., 2014; Thierry et al., 2009) seguido por la reorganización del citoesqueleto y modificaciones de la matriz extracelular, también necesarios para la adquisición de movilidad celular (figuras 12-13). A pesar de relacionarse con la cohesividad celular, la E-cadherina, como será mostrado en la sección 3.3, se requiere durante la migración celular colectiva para mantener la direccionalidad de la migración y la coordinación entre las células del grupo migrador.

TABLA 2

10. **Cadherinas:** Glicoproteínas transmembrana responsables de las uniones célula-célula para mantener la integridad tisular. La E-cadherina, es la principal cadherina encontrada en tejidos epiteliales, estableciendo interacciones homofílicas (cad-cad). La N-cadherina es la principal cadherina expresada en neuronas.
11. **Uniones adherentes:** Unión entre la membrana plasmática de células adyacentes de naturaleza endotelial o epitelial. Son áreas formadas por una densa capa de glucoproteínas transmembrana (cadherinas) y microfilamentos de actina del citoesqueleto
12. **Uniones ocluyentes:** Estructuras citológicamente muy bien definidas, presentes en endotelio y epitelio que crean una barrera impermeable entre células. A nivel estructural destaca la presencia de proteínas como Claudinas y Ocludinas.
13. **Polaridad celular:** Característica principal de muchos tipos celulares consistente en la distribución asimétrica de sus componentes dentro de la célula
14. **Polaridad apico-basal:** Característica de células epiteliales en la que existen dos dominios de la membrana citoplasmática diferenciados en cuanto a su composición lipídica y proteica. La polaridad apico-basal contribuye a la adquisición de la morfología celular y transporte direccional que caracteriza a la función epitelial. Dos tipos de adhesiones intercelulares contribuyen a la formación y mantenimiento de los dominios apical y basolateral, las uniones adherentes y las uniones ocluyentes. Existen tres grupos principales de proteínas reguladoras de la polaridad apico-basal que se encuentran altamente conservados. El complejo de polaridad PAR, que comprende las proteínas PAR3/PAR6/aPKC y CDC42, las cuales promueven el establecimiento del borde apical-lateral. El complejo CRB/PALS/PATJ formado por la proteína transmembrana CRB (crumbs) y las proteínas citoplasmáticas asociadas PALS1 (=MPP5) y PATJ (PALS1 associated tight junction; =INADL) y que es requerido para establecer el dominio apical. Y, el complejo Lgl/Dlg/Scribble, formado por Scribble, Lgl (*lethal giant larve*), y Dlg (Disc Large) el cual define el dominio basolateral (Martin-Belmonte and Perez-Moreno, 2011).
15. **Lámina basal:** Capa de matriz extracelular compuesta de laminina, colágeno IV y proteoglicanos, dispuesta en la superficie basal de un epitelio.

En *Drosophila melanogaster*, así como en Vertebrados, se han identificado varios factores de transcripción involucrados en la regulación de la transición epitelio mesénquima (EMT) entre los que destaca *snail*. Snail, junto con el factor de transcripción Twist, regula la formación del mesodermo en *Drosophila*, evento morfogénético que involucra un proceso de EMT (Kosman et al., 1991; Perry et al., 2010; Thiery et al., 2009).

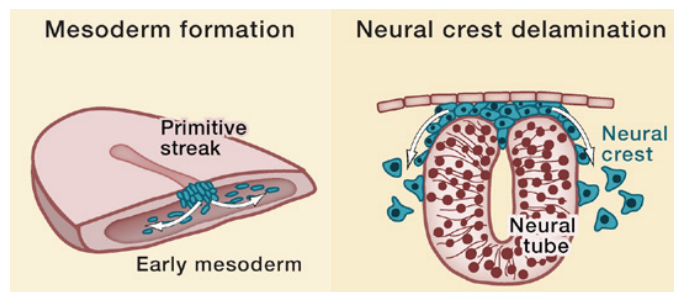


Figura 12. EMT durante el desarrollo de vertebrados. La **formación del mesodermo** (izquierda) es un evento morfogénético temprano durante el desarrollo embrionario en el que un epitelio experimenta una EMT, donde las células adquieren capacidad de segregarse y migrar para generar los diferentes tipos de mesodermo. Otro ejemplo de EMT, es el experimentado por las células de la **cresta neural** (derecha). Una vez las células delaminan separándose del tubo neural, migrarán y se diferenciarán en diferentes tipos celulares (**Figura adaptada de Thiery et al; 2009**).

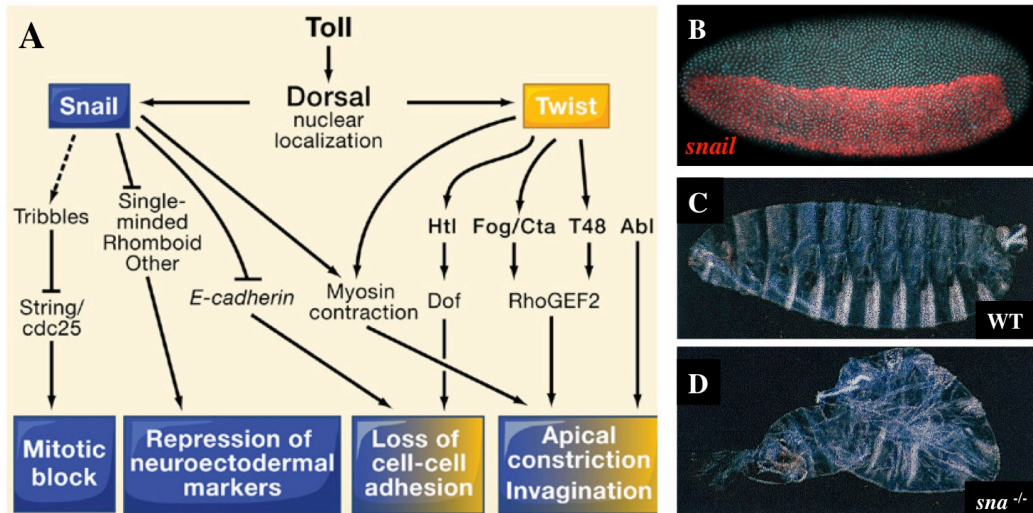


Figura 13. Red genética controlada por *snail* y *twist* para la formación del mesodermo en *Drosophila*. (A) Los factores de transcripción Snail y Twist cooperan para modular la adhesión celular y cambios en el citoesqueleto, dando lugar a la invaginación y segregación del mesodermo. Las flechas indican interacciones genéticas, no regulación transcripcional directa. Abl, Abelson quinasa; Htl (Heartless; *Drosophila* FGF receptor), Dof (*downstream* of FGFR), Fog/Cta (*folded gastrulation/concertina*). (B) Vista lateral de un embrión (st 4, blástula) mostrando en rojo la expresión ventral de *snail* (ARN *in situ*). (C) Cutícula de larva silvestre. (D) Cutícula de un mutante *snail*. La falta de función de *snail*, provoca defectos en la gastrulación generando un fenotipo aberrante. **A, adaptada de (Thiery et al., 2009). B, adaptada de (Perry et al., 2010). C-D adaptada de (Hemavathy et al., 2000).**

La formación del mesodermo en la blástula a partir del epitelio ventral, se inicia en *Drosophila* con la activación directa de *twist* y *snail*, por el factor de transcripción Dorsal, involucrado en el establecimiento del patrón dorso-ventral embrionario. Twist, funciona como un co-activador de Dorsal para la activación de *snail*. La cooperación entre Dorsal y Twist, establece un patrón de expresión preciso de *snail* en el blastodermo ventral (Kosman et al., 1991). Twist induce una constricción apical en el blastodermo ventral, que involucra la actividad RhoGEF2 (regulador positivo de la vía de señalización RhoGTPasa), que se acumula a nivel de la constricción apical (Kolsch et al., 2007). Snail, bloquea la mitosis celular, a través de la represión del factor de transcripción *string* (homólogo de CDC25) esencial para la entrada en mitosis. Simultáneamente, *snail* reprime la transcripción de la E-cadherina (la proteína materna se redistribuye) e induce la generación de los pulsos de contracción de miosina necesarios para la constricción apical mientras que Twist mantiene el estado de constricción entre pulsos (Thiery et al., 2009).

Tras la invaginación y EMT, el mesodermo entra en contacto con el ectodermo, se expande y migra dorso-lateralmente dirigido por ligandos de la vía de FGF, dando lugar a la capa de mesodermo (Figura 14). A lo largo de la migración dorso-lateral, el mesodermo se diferenciará en mesodermo cardiaco, somático o visceral, dependiendo de la activación de diferentes vías de señalización (Schafer et al., 2014; Wu et al., 1995; Yin et al., 1997).

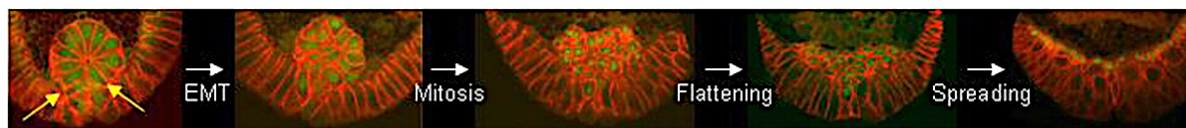


Figura 14. Formación del mesodermo en *Drosophila*. Secciones transversales del embrión de *Drosophila*. Después de la invaginación y EMT, las células se expanden sobre la superficie basal del ectodermo (*flattening*). Las células mesodérmicas más dorso-laterales migran dorsalmente guiadas por una fuente local del ligando FGF procedente del ectodermo (nucleos verdes, anti-Twist; membranas en rojo, anti-Neurotactin). **Figura adaptada de (Clark et al., 2011).**

El mesodermo en *Drosophila* constituye un ejemplo de cómo a través de un proceso de EMT, un epitelio adquiere características mesenquimales, tales como cambios de la morfología celular, pérdida de polaridad apico-basal y represión transcripcional de la E-cadherina. En relación a la E-cadherina, se ha propuesto que la regulación de su distribución en la membrana durante la EMT, es mucho más relevante que la regulación de sus niveles de transcripción (Schafer et al., 2014). En esta nueva localización celular, la E-cadherina contribuiría a mantener la cohesividad de las células del mesodermo, permitiendo su migración colectiva, en contraste con su función en los epitelios a través de las uniones adherentes donde contribuye a la integridad de la barrera epitelial.

Cabe además destacar, que no todos los procesos de EMT están regulados por *snail*. Este es el caso de la formación del intestino medio de *Drosophila* que tiene su origen en células epiteliales endodérmicas que se transforman en mesenquimales y migran colectivamente sin que se produzca una represión transcripcional de la E-cad. Este proceso es regulado por el factor de transcripción *serpent* que reprime al regulador apical *crumbs* (tabla 2), lo cual conduce a una redistribución sub-celular de la E-cadherina que permite la migración manteniendo la cohesividad del grupo (Campbell et al., 2011).

En definitiva, el proceso de EMT es esencial para la morfogénesis y particularmente para la migración celular colectiva. Existen diversos grupos de células de origen epitelial que migran colectivamente después de experimentar una EMT, entre los que podemos encontrar distintos grados de transición-epitelio mesénquima con particularidades específicas para cada grupo celular.

3.3 Otros Modelos de migración celular colectiva

Múltiples ejemplos de migración celular colectiva se han descrito durante el desarrollo de diferentes especies animales. La posibilidad de combinar sofisticados experimentos genéticos, marcaje celular y métodos de microscopía confocal *in vivo* ha permitido entender algunos de los mecanismos que controlan la migración colectiva. Destacan en este sentido modelos como las *border cells* o la tráquea de *Drosophila* y en vertebrados destaca el estudio de la línea lateral y la cresta neural.

3.3.1 *Border cells* de *Drosophila melanogaster*

El oocito madura en la cámara ovárica (*egg chamber*) constituida por un epitelio de células foliculares que rodean a 15 células nodrizas (*nurse cells*) en la parte anterior y al oocito situado en la zona posterior. Las dos células mas anteriores del epitelio folicular llamadas células polares (*polar cells*) secretan la citoquina Unpaired, activando la vía de señalización JAK/STAT en 6-10 células adyacentes que como resultado se especifican formando las *border cells* (figura 15D).

Las *border cells* adquieren actividad migradora, rodean a las *polar cells* formando un grupo compacto que migra hacia el oocito utilizando como sustrato a las *nurse cells* (Figura 15E). Inicialmente, las *border cells* se segregan del epitelio folicular y la lámina basal que rodea a la cámara ovárica extendiendo entre las *nurse cells* proyecciones de membrana ricas en actina (Montell et al., 2012). Cuando alcanzan la parte anterior del oocito, las *border cells* forman una estructura denominada micrópilo, involucrada en la entrada del esperma.

Una característica interesante de las *border cells*, es que a pesar de perder la conexión con el epitelio donde se originan, retienen características epiteliales (polaridad apico-basal) y a su vez, presentan características mesenquimales (invasividad y motilidad). Esta EMT parcial, contrasta con la completa pérdida de polaridad apico-basal inducida por *snail* en el mesodermo. El complejo de polaridad apical, Par-3/Par-6/aPKC (tabla 2), se localiza en la superficie apical de todas las células del epitelio folicular manteniéndose en las *border cells* tras separarse del mismo (figura 15). Inicialmente, a medida que las *border cells* adquieren motilidad producen protusiones de membrana basolateral. Cuando inician su movimiento entre las *nurse cells*, se reorientan de modo que la superficie apical mucho menos dinámica y que retiene a las proteínas apicales Par-3/Par-6/aPKC, queda orientada ortogonal a la dirección de migración (Montell et al., 2012). Se ha demostrado que las proteínas apicales, como el complejo Par-3/Par-6/aPKC, son necesarias para mantener la cohesividad del grupo. La reducción de la expresión de Par3 o Par6, reduce la adhesividad de las *border cells* y produce eventualmente su separación (Pinheiro and Montell, 2004). Además de favorecer la adhesividad, se ha propuesto que el mantenimiento del complejo de polaridad Par-3/Par-6/aPKC, estaría involucrado en el establecimiento de dominios funcionales en diferentes partes de la célula (Pinheiro and Montell, 2004).

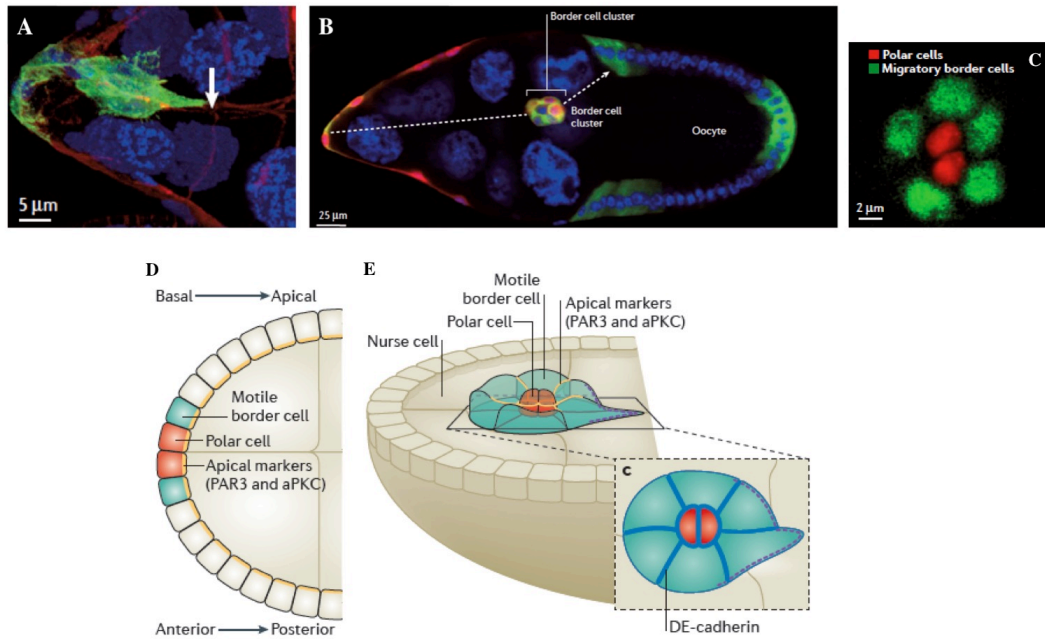


Figura 15. Migración colectiva de las *border cells* de *Drosophila melanogaster*. (A) *Border cells* segregando del epitelio folicular con una morfología polarizada en el frente de migración (flecha). Las *border cells* están marcadas en verde con GFP, los filamentos de actina están teñidos en Rojo con faloidina y los nucleos en azul con DAPI. Las *nurse cells*, teñidas solo con DAPI, son poliploides destacando por su gran tamaño. (B) Visión general de la cámara ovárica y las *border cells* durante su migración. El oocito, ocupa la mayor parte del espacio sin tinción. Todos los nucleos están teñidos con DAPI, y las *border cells* coexpresan GFP, en verde, y un marcador de ecdisona en rojo. (C) Marcaje específico de las *border cells* en verde con anti-Eye (*Eyes absent*) y las *polar cells* marcadas en rojo con un anticuerpo que reconoce β -Gal expresada desde el gen *FasIII*. (D) Representan a las *border cells* antes de su separación rodeando a las células polares, así como la localización apical de PAR3 y aPKC. (E) Representa las *border cells* una vez iniciada la migración y cómo se mantiene la expresión de marcadores apicales de manera ortogonal a la dirección de migración. Se muestra en detalle una sección (c), ilustrando la distribución de la E-cadherina. Los niveles de E-cad son mayores entre *border cells* y, entre *border cells* y las dos *polar cells* (en rojo), con respecto a la interfase entre *border cells* y *nurse cells*. En la sección (c) el eje apico-basal es perpendicular al plano. En todos los casos anterior está a la izquierda. (Figura adaptada de Montell et al., 2012).

Otra proteína de polaridad, la Ser/Thr quinasa Par1, que se localiza basolateralmente está involucrada en la segregación de las *border cells* del epitelio folicular y su migración (McDonald et al., 2008). Par1, mediante fosforilación, inactiva a la fosfatasa de la proteína motora miosina II, incrementando los niveles de fosfo-miosina II activa de manera polarizada en la parte anterior del grupo celular. De esta manera, se generan las fuerzas contráctiles necesarias que contribuyen a la segregación del epitelio folicular (Majumder et al., 2012). La fosfo-Miosina II también se acumula durante la migración en las células frontales. Se ha propuesto que esto contribuye a retraer las protusiones de membrana (Majumder et al., 2012). Estos datos indican una importante contribución de proteínas de polaridad celular a la coordinación del movimiento colectivo.

Respecto a la detección de señales externas que contribuyen a la migración direccional de las *border cells* hacia el oocito, destacan dos receptores tirosina-quinasa: PVR (*platelet-derived growth factor-PDVF-and vascular endotelial growth factor-VEGF-receptor related*) y EGFR (*epidermal growth factor receptor*). PVR une el ligando Pvf1 y EGFR une a los ligandos Spitz, Keren y Gurken que son secretados por el oocito. Ambos receptores presentan una actividad parcialmente redundante, y solamente la pérdida de función de ambos interrumpe de manera drástica la migración direccional de las *border cells*. Esta señalización celular resulta en una activación localizada de la RhoGTPasa, Rac, que regulará la formación de protusiones de membrana ricas en actina en las células del frente de migración (Wang et al., 2010). Las extensiones de membrana generadas por la actividad Rac GTPasa, tienen una longitud mayor que un filopodio, entre 10-20 μm y son más estrechas que un lamelipodio.

Es interesante el hecho de que la fotoactivación de una forma constitutivamente activa de Rac, en una única *border cell* que no esté en el frente de migración, induce la formación de proyecciones de membrana en dicha célula y las reprime en el frente, reorientándose la dirección de migración del grupo. Igualmente, la inhibición de la actividad Rac en el frente genera aleatoriamente protusiones de membrana en células anteriores o laterales del grupo (Wang et al., 2010). Este hecho implica la existencia de un proceso de comunicación entre las células del primordio que permite coordinar una respuesta conjunta a los cambios de organización del citoesqueleto. En este sentido, es muy destacable la contribución de la E-cadherina al movimiento direccional y colectivo de las *border cells*.

La E-cadherina, de manera contraria a lo que sucede en otros sistemas de migración que experimentan una EMT completa, se expresa a elevados niveles durante la migración de las *border cells* (figura 15). Se ha demostrado que las uniones Ecad-Ecad entre las *border cells* y las *nurse cells* son esenciales para la direccionalidad de la migración (Cai et al., 2014). Más específicamente, la actividad Rac GTPasa inducida por EGFR y PVR genera proyecciones de membrana causadas por la polimerización de actina, generando tensión sobre las moléculas de E-cad que median la adhesión con las *nurse cells*. Se ha propuesto, que la E-cad contribuiría a generar un *feedback loop* positivo entre las fuerzas mecánicas generadas por la red de actina en el frente de migración y la señalización por Rac, amplificando la activación de Rac y así generar, de manera persistente, extensiones de membrana en el frente de migración (Figura 16). Aunque el mecanismo bioquímico subyacente en las *border cells* no se conoce, en otros sistemas se ha comprobado que las uniones Cadherina-Cadherina entre dos células conducen al reclutamiento de GEF que activarían la señalización por Rac localmente (Birukova et al., 2012). Dado que Rac estimula la formación de proyecciones de membrana ricas en actina que estabilizan las adhesiones Ecad-Ecad, este proceso proporcionaría un mecanismo directo de *feedback* positivo. El hecho de que exista un gradiente de concentración para la E-cadherina a lo largo de la ruta de migración de las *border cells* (Cai et al., 2014) reforzaría este mecanismo de *feedback*.

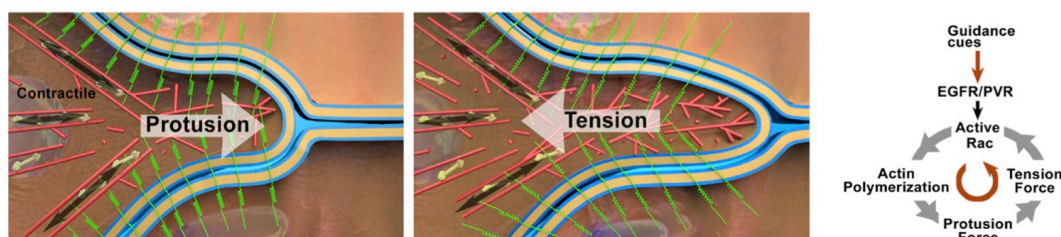


Figura 15. Mecanismo de migración direccional de las *border cells* mediado por E-cad. Se ilustra cómo las fuerzas generadas por la polimerización de actina en las proyecciones de membrana generan tensión sobre la E-cadherina en el frente de migración. La E-cadherina se representa en verde, la actina en rojo y las membranas de las *border* y *nurse cells* en dorado. También se ilustra el mecanismo de *feedback* positivo entre la polimerización de actina y la tensión sobre la E-cadherina. (imagen adaptada de Cai et al., 2014).

Se han mostrado también, dos funciones adicionales de la E-cadherina en el comportamiento de las *border cells*. Por un lado, la E-cad contribuye a la comunicación entre las *border cells*, ya que la reducción de los niveles de E-cadherina y la actividad RAC de manera específica en una única célula, limita la generación de proyecciones de membrana en las células adyacentes (Cai et al., 2014). En otro estudio se mostró que la proteína Moesina (ERM *family*) que conecta los filamentos de actina corticales con la membrana plasmática y la proteína Rab11 (regulador de exocitosis y reciclaje de vesículas) son también requeridos para la comunicación entre las *border cells* (Ramel et al., 2013). Ambos estudios, sugerirían que la fuerza de tracción generada por una célula del grupo, es transmitida al resto a través de la E-cadherina y el citoesqueleto cortical de filamentos de actina, inhibiendo la generación de proyecciones de membrana en el resto de células. Finalmente, también se ha demostrado que las uniones Ecad-Ecad entre las *polar cells* y las *border cells* migradoras, son esenciales en el mantenimiento de la cohesividad del grupo (Cai et al., 2014).

3.3.2 Línea lateral de *Danio rerio*

La línea lateral es un órgano mecanosensorial de vertebrados acuáticos implicado en la detección de desplazamientos de la masa de agua, así como la propia propulsión del animal. Esta información contribuye al desarrollo de comportamientos de huida de depredadores o captura de presas. La formación de la línea lateral posterior (pLL; *posterior lateral line*) ha sido estudiada como modelo de migración colectiva en *Danio rerio* (pez zebra).

La línea lateral posterior tiene su origen embrionario 18 horas después de la fertilización en una placoda (engrosamiento de células ectodérmicas) localizada posteriormente a la vesícula ótica en la región cefálica del embrión. Un grupo de unas cien células caudales de esta placoda se separan de la membrana basal subyacente para formar el primordio de la línea lateral posterior, que migra cohesivamente por debajo de la epidermis desde la región cefálica hasta el extremo de la cola a lo largo de un sustrato de tejido conectivo, el miosepto (Chitnis et al., 2012; Dambly-Chaudiere et al., 2003).

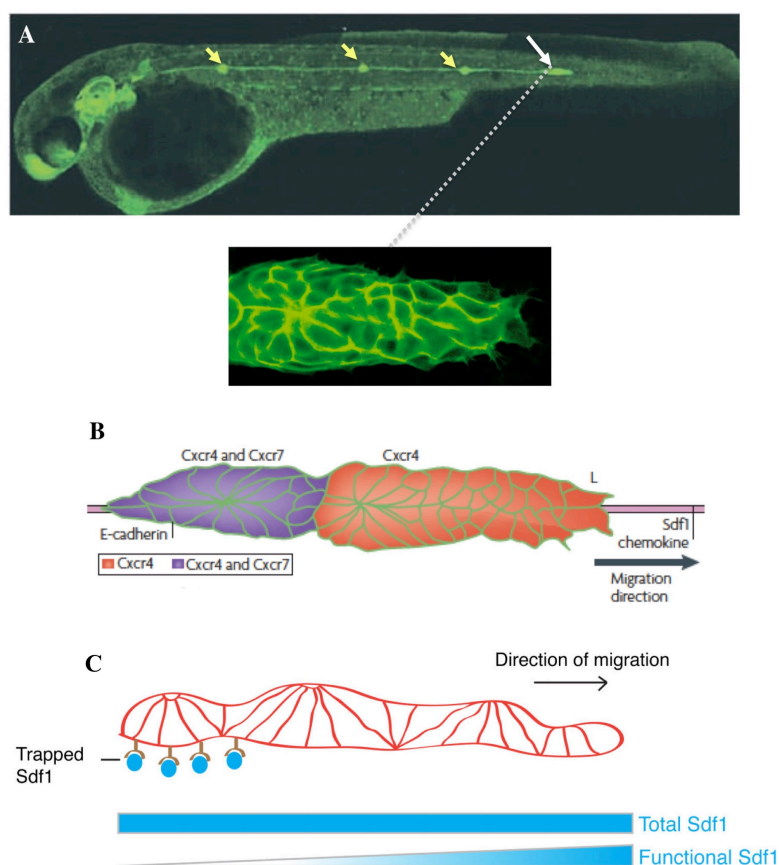


Figura 16. Línea lateral del pez zebra. (A) Visión lateral de un embrión donde se observa la migración del primordio de la línea lateral posterior marcado con GFP de membrana. Las flechas amarillas señalan los neuromastos depositados, la flecha blanca señala al grupo migrador. (B) Esquema del grupo migratorio. El dominio migrador (naranja), expresa solamente el receptor CXCR4 mientras que el anterior (morado) expresa tanto CXCR4 como CXCR7. Ambos receptores unen la quimioquina SDF-1. La E-cadherina contribuye a la cohesión interna del primordio. Una línea rosa representa las células que expresan SDF-1 a lo largo de la ruta de migración. (C) Visión lateral del grupo migratorio. Células seguidoras del dominio anterior unirían SDF-1 (esferas azules), a través del receptor de membrana CXCR7 (representado en color marrón), previniendo la activación de CXCR4, y contribuyendo a polarizar la migración del grupo. En todos los casos anterior se sitúa a la izquierda. **A-B, adaptada de (Friedl and Gilmour, 2009). C, adaptada de (Cai and Montell, 2014).**

A lo largo de su ruta de migración, el primordio de la línea lateral va depositando secuencialmente grupos de neuromastos (unidad funcional sensorial; Figura 16). La migración del grupo de células es dirigida por la ruta de señalización SDF-1/CXCR4 (Friedl and Gilmour, 2009). SDF-1 (*stromal cell-derived factor 1*) es una quimioquina de la familia CXC que se expresa de manera uniforme a lo largo de la ruta de migración de la línea lateral posterior. SDF-1 es el ligando del receptor CXCR4 (subfamilia CXCR), una proteína con 7 dominios transmembrana acoplada a proteína G. Todas las células de la línea lateral posterior expresan CXCR4, pero solamente las células del frente de migración necesitan activar este receptor para dirigir la migración direccional de todo el grupo. Se ha mostrado que la migración colectiva unidireccional, es consecuencia de la generación de un gradiente del ligando SDF-1 por el propio primordio a lo largo de su migración (Figura 16).

Para generar dicho gradiente, las células seguidoras del primordio, expresan el receptor CXCR7 el cual une el ligando SDF-1 retirándolo del sustrato de migración antagonizando de esta manera, la actividad del receptor CXCR4 (Figura 16). Por tanto, la respuesta de las células líder a los elevados niveles de SDF-1 en el frente de migración, mantendría la migración unidireccional de manera persistente (Dalle Nogare et al., 2014; Dambly-Chaudière et al., 2007; Dona et al., 2013).

En relación a la regulación de la dinámica de actina en la línea lateral, se ha mostrado que la subunidad $G\beta 1$, componente del complejo proteína G heterotrimérica (asociado a receptores GPCR como CXCR4) es esencial para la generación de proyecciones de membrana en el frente de migración. Se ha sugerido que el eje de señalización SDF-1/CXCR4/ $G\beta 1$, activaría localmente a reguladores del citoesqueleto como Rac (Xu et al., 2014).

3.4.3 Sistema traqueal de *Drosophila melanogaster*

El sistema traqueal de *Drosophila melanogaster* constituye un modelo para el estudio de la migración celular colectiva en el contexto de la morfogénesis de una estructura tubular. Comparado con las *border cells* y la línea lateral, la migración traqueal se produce a través de un ambiente tisular muy heterogéneo.

Las tráqueas se originan de diez grupos bilaterales de células ectodérmicas, situadas desde el segundo segmento torácico hasta el octavo segmento abdominal (figura 17). Cada primordio traqueal, de aproximadamente 20 células, invagina y lleva a cabo dos rondas mitóticas iniciando un complejo proceso de ramificación controlado por el ligando de la vía FGF, *breathless*, secretado por grupos de células que rodean al primordio traqueal (Sutherland et al., 1996). Las células traqueales expuestas a mayores niveles de señalización por FGF son establecidas como células líder de cada rama, produciendo un elevado número de filopodios y pseudopodios dirigidos hacia la fuente de ligando (Ribeiro et al., 2004). Adicionalmente, FGF activa en las células líder la expresión y producción de Delta, ligando de la vía de señalización Notch, el cual reduce la respuesta a *breathless* en las células seguidoras intermedias de las ramas traqueales (Ghabrial et al., 2003). Un hecho destacable es que la tráquea no experimenta una EMT ni pierde las características epiteliales durante su migración (Letizia et al., 2011).

La formación de las ramas traqueales dorsales, es ideal para comprender la reorganización de un tejido epitelial que dará lugar a una estructura tubular. Cada rama dorsal está constituida por seis células intermedias y dos células líder que son las únicas que tienen actividad migradora, con una elevada producción de filopodios (Figura 17).

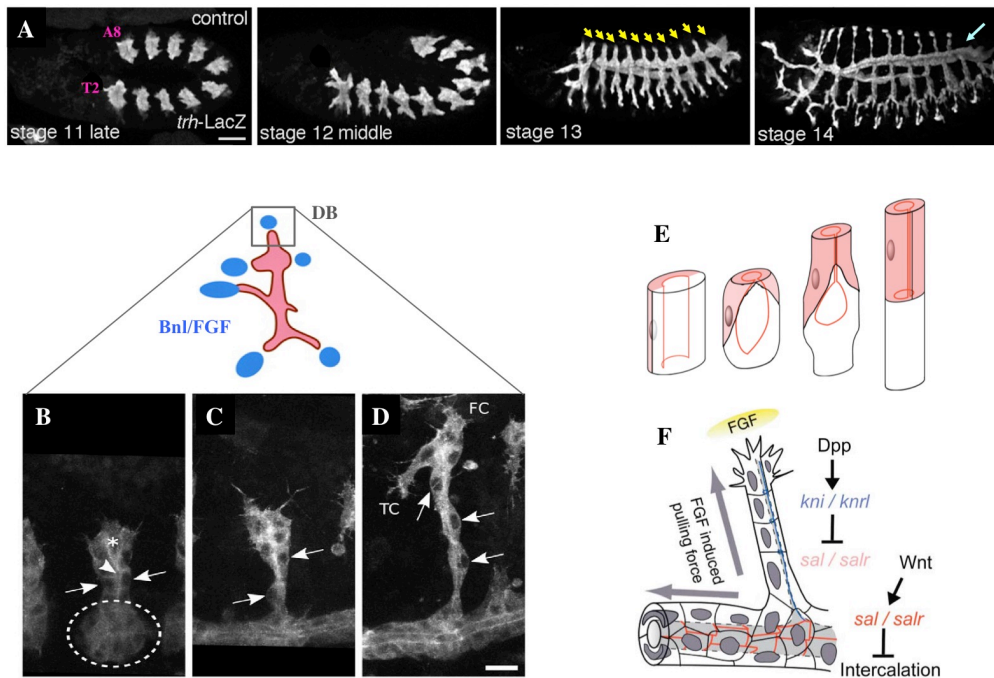


Figura 17. Migración de la Tráquea de *Drosophila*. (A) Vista lateral de embriones *trachealeless-LacZ* (*trh-LacZ*) revelando la organogénesis traqueal. En el St11 (aproximadamente 6 horas después de la fecundación) diez primordios traqueales ectodérmicos localizados desde el segundo segmento torácico (T2) hasta el octavo abdominal (A8) invaginan. En el St12 cada primordio forma varias ramas traqueales que migran hacia los distintos órganos o hacia otras tráqueas con las que se fusionan en st14. Las flechas amarillas señalan las ramas dorsales. La flecha azul señala la rama troncal dorsal. (B-D) ilustra tres fases de la formación de una rama dorsal inducida por una fuente local del ligando Bnl. En (B) se muestra el comienzo de la elongación, donde las células del extremo de la rama (asterisco) producen filopodios, mientras que células intermedias alineadas (flechas) conectan el extremo con el tronco dorsal (elipse), generando el lumen de la rama dorsal (cabeza de flecha). A medida que la migración de la célula líder del extremo avanza (C-D), las células intermedias reorganizan su posición por intercalación celular (flechas) constituyéndose un lumen unicelular. Una de las células migradoras, denominada *fusion cell* (FC), se fusiona con la contralateral conectando las ramas dorsales de cada lado del embrión (D). La otra célula migradora denominada *terminal cell* (TC; D), dará lugar a una rama unicelular con un lumen intracelular (Gervais and Casanova, 2010). (E) Intercalación de dos células traqueales. Se destaca el lumen de una única célula, representando las uniones adherentes como una línea roja. Inicialmente las dos células se localizan paralelamente adhiriéndose la una a la otra, con la superficie apical de ambas delimitando un lumen común. Progresivamente se produce una reorganización que dará lugar a una adhesión autocelular y un lumen celular constituido por una única célula. Nótese la formación de uniones adherentes autocelulares. (F) Regulación genética *upstream* responsable del proceso de intercalación celular. La señalización por *wingless* (Wg) activa a Spalt que bloquea la intercalación en la rama troncal principal. La señalización dorsal por *decapentaplegic* (Dpp; vía TGF) previene la activación de Spalt y permitiendo la intercalación en la rama dorsal A, adaptada de (Matsuda et al., 2015). B-D, adaptada de (Caussinus et al., 2008). E-F, adaptada de (Ribeiro et al., 2004)

La elongación de las ramas traqueales dorsales requiere un proceso de intercalación celular. Esto es, grupos de células en contacto, cuya superficie apical contribuye a la formación de un lumen común, reorganizan su posición para permitir la elongación de la rama traqueal y la formación de una estructura tubular que al final del proceso presentará un lumen delimitado por la superficie apical de una sola célula. Durante la formación de la rama troncal dorsal (figura 17) no se produce intercalación celular, estando en este caso el lumen delimitado por la superficie apical de varias células, teniendo la rama mayor diámetro.

El estudio de las ramas dorsales ha mostrado que la intercalación celular requiere la generación de tensión mecánica y la regulación de la adhesión intercelular. Experimentos con ablación láser demuestran que la fuerza de tracción generada por la migración de la célula líder en el extremo de las ramas dorsales es suficiente para promover el proceso de intercalación celular y elongación de la rama traqueal (Caussinus et al., 2008). Este proceso, debe estar coordinado con la remodelación de las uniones adherentes entre las células. Se ha demostrado que la modulación del reciclaje intracelular de la E-cadherina es importante para la regulación de la intercalación celular (Shaye et al., 2008).

El factor de transcripción Spalt, activado específicamente en la rama troncal dorsal (Ribeiro et al., 2004) reprime la intercalación celular (figura 17). Proteínas como Rab5 y Shi implicadas en la internalización de vesículas de membrana, inician la ruta de reciclaje de la E-cadherina. Spalt, a través de la activación de la proteína dRip11, un efector para la acumulación y función de la proteína Rab11 (que controla el reciclaje de vesículas) promueve una elevada dinámica de reciclaje de la E-cadherina y de esta manera el incremento de la adhesividad bloqueando la intercalación celular en la rama troncal dorsal (Shaye et al., 2008). Por el contrario, en las ramas dorsales donde la expresión de Spalt está reprimida existe un menor reciclaje de la E-cadherina, también dependiente de Rab11 que conduce a una disminución de la adhesividad celular permitiendo la intercalación sin que se reprima por completo el reciclaje de la E-cadherina ya que bajos niveles de E-cad son necesarios para dicho proceso. Otra proteína efectora de Rab11, Nuf, promovería la función de Rab11 en las ramas dorsales (Shaye et al., 2008).

3.4.5 Cresta neural de vertebrados

La cresta neural se origina de una población neuroectodérmica multipotente formada entre la placa neural y las células ectodérmicas no neurales (Figura 18). Durante la gastrulación los precursores de las células de la cresta neural delaminan y migran, diferenciándose progresivamente en diferentes tipos celulares en base a señales del microambiente tisular recibidas a lo largo de su migración y destino final (Bronner and LeDouarin, 2012).

Durante la neurulación, la región del ectodermo que dará lugar a la cresta neural se eleva durante el pliegue de la placa neural (Figura 18). En este momento empiezan a expresarse genes específicos de la cresta neural tales como *Sox10* y *FoxD3*. A continuación, los precursores de la cresta neural pierden su conexión con el sistema nervioso a través de un proceso de EMT regulado, entre otros genes, por *snail* (*snail1/2*) y *twist* (Simoies-Costa and Bronner, 2015). En la cresta neural de embriones de pollo se produce una represión transcripcional de las cadherinas epiteliales N-cad, E-cad y cad6b, así como activación de (tipo 2) Cad11 y Cad7 (figura 18), conduciendo a cambios en la adhesión celular, segregación y migración de la cresta neural (Simoies-Costa and Bronner, 2015).

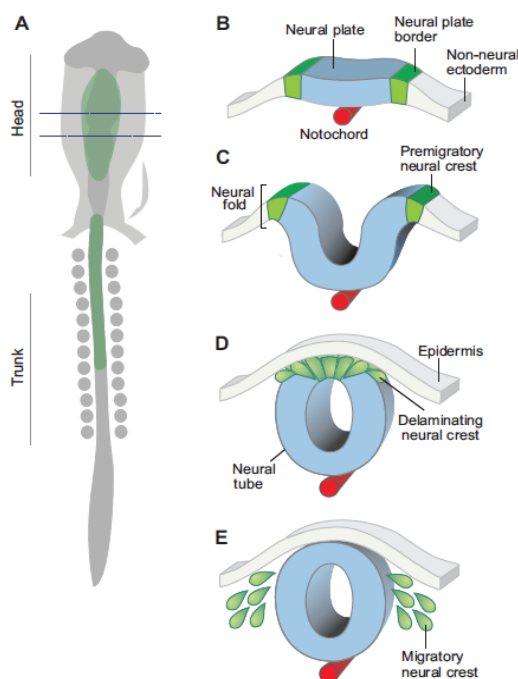


Figura 18. Desarrollo de la cresta neural de pollo. (A) Visión dorsal de la cresta neural (verde). Las líneas punteadas horizontales corresponden a las secciones transversales ilustradas en (B-E). (B) El desarrollo de la cresta neural comienza en la fase de gástrula con la especificación del borde de la placa neural (*neural plate border*). (C) A medida que se produce el cierre del tubo neural, se especifican los progenitores de la cresta neural que a continuación experimentan una EMT (D-E), segregando del tubo neural e iniciando un proceso de migración para dar lugar a diferentes tipos celulares (células neuronales, secretoras, pigmentarias, etc). **Figura adaptada de (Simoes-Costa and Bronner, 2015).**

En el anfibio *Xenopus laevis*, sin embargo, la segregación y migración de la cresta neural requiere la pérdida de la E-cadherina y la ganancia de expresión de la N-cadherina (Figura 19). Dicha expresión diferencial de cadherinas se requiere para promover el proceso de inhibición de la migración por contacto (Scarpa et al., 2015). Este mecanismo contribuye de manera fundamental a la migración direccional de las células de la cresta neural, las cuales no migran como un grupo compacto.

La inhibición de la migración por contacto se observa cuando tras la colisión entre dos células se inhiben las protusiones de membrana en el sitio de contacto, estableciéndose nuevas proyecciones en direcciones diferentes. De esta manera, las proyecciones de membrana entre las células seguidoras y líderes se bloquean, promoviendo simultáneamente en las células líderes el mantenimiento de la migración en sentido contrario a sus contactos con las seguidoras (Figura 19).

Por otro lado, la cresta neural migra en bandas separadas lateralmente debido a interacciones quimotácticas repulsivas (análogas a la inhibición por contacto) que contribuyen a definir la ruta de migración de la cresta neural (figura 19). En el control de este aspecto destacan las interacciones entre los receptores tirosina quinasa Eph y su ligando transmembrana (*Ephrin*; Eph *receptor-interacting proteins*; señalización bidireccional), así como como los receptores transmembrana Nrp (*neuropilin*) y sus ligandos, las Semaforinas (Minoux and Rijli, 2010).

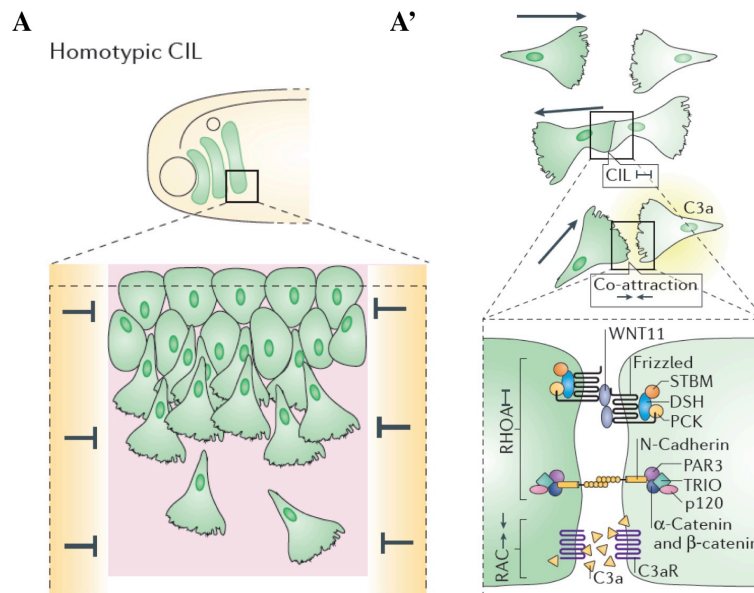


Figura 19. Bases moleculares de la migración celular colectiva de la cresta neural. (A) Migración en oleadas de células en la cresta neural de *Xenopus*. Se ilustra como la ruta de migración se restringe por señales inhibitorias laterales. (A') El mecanismo de inhibición por contacto involucra a la N-cadherina así como la acumulación de los componentes de la vía de señalización no-canónica Wnt-Planar Cell Polarity (PCP), incluyendo el ligando secretado Wnt11, lo cual conduce a la activación de RhoA (familia RhoGTPasa) en la zona de contacto. Frizzled es el receptor principal de la vía Wnt-PCP. Frizzled recluta a las proteínas WNT11, STBM (*Strabismus*), DSH (*Dishevelled*) y PCK (*Prickle 1*). La N-cadherina recluta p120, α y β -catenina, PAR3 (proteína polaridad apical) y TRIO (*triple functional domain protein*). La consecuencia es la inhibición de RAC1 (y de la polimerización de actina) en la zona de contacto, promoviendo una repolarización de la actividad Rac y el alejamiento de una célula respecto a la otra. En las células de la cresta neural, la inhibición por contacto se integra con otras señales intercelulares, como la quimiotaxis autocrina entre las células, mediado por la quimioquina C3a y su receptor que contribuye a mantener la cohesión del grupo sin la existencia de un contacto físico mediado por moléculas de adhesión. Así mismo, el conjunto de las células se dirigen hacia una fuente de ligando SDF-1 secretado por placodas de células ventrales (no representado). **Figura adaptada de (Stramer and Mayor, 2016).**

En *Xenopus laevis*, las células craneales de la cresta neural (originadas en la región más anterior del embrión) inicialmente migran como un grupo cohesivo y progresivamente se disocian en células que migran individualmente hacia una fuente de la quimioquina SDF-1. El mecanismo de inhibición por contacto (figura 19) contribuye a que la población celular migre de manera colectiva y polarizada restringiendo las proyecciones de membrana entre células vecinas (Theveneau and Mayor, 2012).

La colisión entre dos células a través de proyecciones de membrana enriquecidas en actina conduce a una inhibición de la Rac1 GTPasa, dependiente de N-cadherina y la vía de señalización no-canónica Wnt-PCP. Diferentes proteínas pertenecientes a la vía Wnt-PCP son reclutadas al sitio de contacto conduciendo a una activación de RhoA e inhibición de Rac1. Se ha sugerido que la inhibición de Rac1 puede ocurrir a través de la actividad antagónica de RhoA. Adicionalmente, el regulador de polaridad apical, PAR3, también reclutado al sitio de contacto, inhibe al activador de Rac1, TRIO (figura 19). En definitiva, la regulación de la actividad de las proteínas de la familia RhoGTPasa es esencial en el mecanismo de inhibición por contacto (Mayor and Etienne-Manneville, 2016; Stramer and Mayor, 2016).

PUBLICACIONES

Artículo 1:

Common origin of insect trachea and endocrine organs from a segmentally repeated precursor

Artículo 2:

Precise long-range migration results from short-range stepwise migration during ring gland organogenesis

Capítulo de libro:

Control of organogenesis by Hox genes

Common Origin of Insect Trachea and Endocrine Organs from a Segmentally Repeated Precursor

Carlos Sánchez-Higueras,¹ Sol Sotillos,¹ and James Castelli-Gair Hombria^{1,*}

¹CABD, CSIC/JA/Universidad Pablo de Olavide, 41013 Seville, Spain

Summary

Segmented organisms have serially repeated structures [1] that become specialized in some segments [2]. We show here that the *Drosophila corpora allata*, prothoracic glands, and trachea have a homologous origin and can convert into each other. The tracheal epithelial tubes develop from ten trunk placodes [3, 4], and homologous ectodermal cells in the maxilla and labium form the corpora allata and the prothoracic glands. The early endocrine and trachea gene networks are similar, with STAT and Hox genes inducing their activation. The initial invagination of the trachea and the endocrine primordia is identical, but activation of Snail in the glands induces an epithelial-mesenchymal transition (EMT), after which the corpora allata and prothoracic gland primordia coalesce and migrate dorsally, joining the corpora cardiaca to form the ring gland. We propose that the arthropod ectodermal endocrine glands and respiratory organs arose through an extreme process of divergent evolution from a metamerically repeated structure.

Results and Discussion

The endocrine control of molting and metamorphosis in insects is regulated by the corpora allata (ca) and the prothoracic glands (pg), which secrete juvenile hormone and ecdysone, respectively [5]. In Diptera, these glands and the corpora cardiaca (cc) fuse during development to form a tripartite endocrine organ called the ring gland (Figure 1A). While the corpora cardiaca is known to originate from the migration of anterior mesodermal cells, the origin of the other two ring gland components is unclear [6, 7].

The tracheae have a completely different structure consisting of a tubular network of polarized cells [4]. The tracheae are specified in the second thoracic to the eighth abdominal segments (T2–A8) by the activation of *trachealess* (*trh*) and *ventral veinless* (*vv1*) [4, 8–12].

We isolated the enhancers controlling *trh* and *vv1* in the tracheal primordia and showed they are activated by JAK/STAT signaling [13]. While the *trh* enhancers are restricted to the tracheal primordia in the T2–A8 segments, the *vv1+2* enhancer is also expressed in cells at homologous positions in the maxilla (Mx), labium (Lb), T1, and A9 segments in a pattern reproducing the early transcription of *vv1* (Figures 1C–1E). The fate of these nontracheal *vv1*-expressing cells was unknown, but it was shown that ectopic *trh* expression transforms these cells into tracheae [14]. To identify their fate, we made *vv1+2-EGFP* and *mCherry* constructs. Although the *vv1+2* enhancer drives expression transiently

[13], the stability of the EGFP and mCherry proteins labels these cells during development. We observed that while the T1 and A9 patches remained in the surface and integrated with the embryonic epidermis, the patches in the Mx and Lb invaginated just as the tracheal primordia did (Figures 2N and 2N'). Next, the Mx and Lb patches fused, and a group of them underwent an epithelial-mesenchymal transition (EMT) initiating a dorsal migration toward the anterior of the aorta, where they integrate into the ring gland (Figures 1F and 2A–2I). To find out what controls the EMT, we studied the expression of the *snail* (*sna*) gene, a key EMT regulator [15]. Besides its expression in the mesoderm primordium, we found that *sna* is also transcribed in two patches of cells that become the migrating primordium (see Figure S1A available online). Using *sna* bacterial artificial chromosomes (BACs) with different *cis*-regulatory regions [16–18], we localized the enhancer activating *sna* in the ring gland primordium (*sna-rg*). A *sna-rg-GFP* construct labels the subset of Mx and Lb *vv1+2*-expressing cells that experience EMT and migrate to form the ring gland (Figures 2B–2I; Movies S1 and S2). Staining with *seven-up* (*svp*) and *spalt* (*sal*) (also known as *salM*) [19, 20] markers, which label the ca and the pg, respectively (Figures 1B and 1G), showed that the *sna-rg-GFP* cells form these two endocrine glands (Figures 2K' and 2M'). The *sna-rg-GFP*-expressing cells in the Mx activated *svp* (Figure 2J), and those in the Lb activated *sal* (Figure 2L) before they coalesced, indicating that the ca and pg are specified in different segments before they migrate.

To test whether Hox genes, the major regulators of antero-posterior segment differentiation [21], participate in gland morphogenesis, we stained *vv1+2-GFP* embryos and found that the Mx *vv1+2* primordium expressed Deformed (*Dfd*) and the Lb primordium Sex combs reduced (*Scr*), while the T1 primordium expressed very low levels of *Scr* (Figure 3A). *Dfd* mutant embryos lacked the ca, while *Scr* mutant embryos lacked the pg (Figure S2). *Dfd* and *Scr* expression in the gland primordia was transient, suggesting that they control their specification. Consistently, in *Dfd*, *Scr* double-mutant embryos, *vv1+2* was not activated in the Mx and Lb patches (Figure 3B), and the same was true for *vv1* transcription. In these mutants, the *sna-rg-GFP* expression was almost absent (Figure 3C), and the ca and pg did not form. In each case, *Dfd* controlled the expression of the Mx patch and *Scr* of the Lb patch.

We tested the capacity of different Hox genes to rescue the ring gland defects of *Scr*, *Dfd* double mutants (Figures 3D, 3G, 3K, and 3O; Figure S3). Induction of *Dfd* with the *sal-Gal4* line in these mutants restored the expression of *vv1+2* (Figure 3G) and *sna-rg-GFP* in the Mx and the Lb. However, in contrast to the wild-type (Figures 2J–2M), both segments formed a ca as all cells express *Svp* (Figures 3E and 3F). Similarly, induction of *Scr* also restored the *vv1+2* (Figure 3K) and *sna-rg-GFP* expression, but both primordia formed a pg as they activate *Sal* and *phantom* [22], an enzyme required for ecdysone synthesis (Figures 3I–3J). The capacity of both *Dfd* and *Scr* to restore *vv1* expression, regardless of the segment, made us test whether other Hox proteins could have the same function. Induction of *Antennapedia* (*Antp*), *Ultrabithorax* (*Ubx*),

*Correspondence: jcashom@upo.es

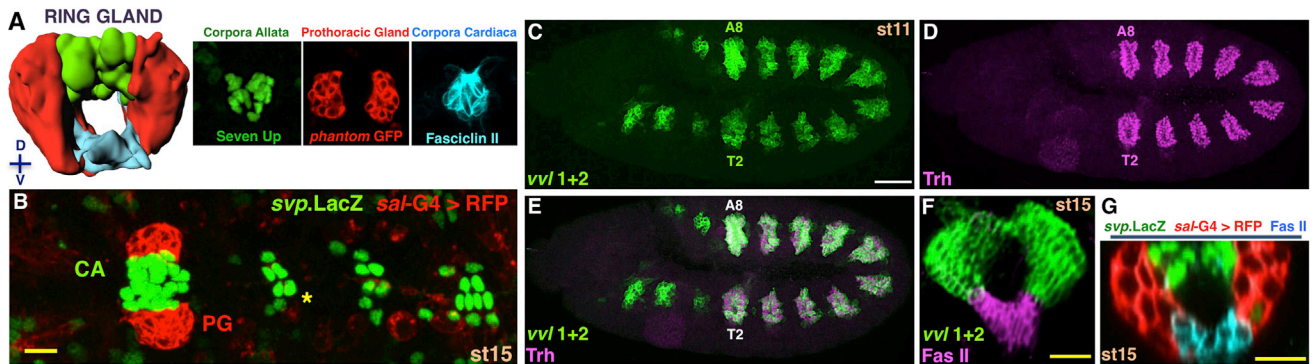


Figure 1. Ring Gland Structure and Primordia Origin

(A) Frontal view reconstruction of a late embryo ring gland showing the position of the three independent glands: the corpora allata (green) expresses *svp*, the prothoracic glands (red) express *phantom*, and the corpora cardiaca (blue) is labeled by *FasII*.
 (B) Dorsal view of a late embryo labeled with *sal-Gal4* driving *UAS-RFP* and *svp-lacZ*. The ring gland is localized anterior to the aorta. Note that *svp* also labels some cardiomyocytes in the aorta and heart (yellow asterisk).
 (C) At extended germ band, *vvl1+2-EGFP* labels the tracheal primordia in T2–A8 as well as cells in more anterior and posterior segments.
 (D) Expression of the *Trh* protein in the ten tracheal primordia as well as the salivary gland.
 (E) Double staining of *vvl1+2* and *Trh*.
 (F) Frontal view of a ring gland in the process of fusing dorsally stained with *FasII* and *vvl1+2-EGFP*. The corpora allata and the prothoracic glands express *vvl1+2* showing their ectodermal origin, while the corpora cardiaca does not.
 (G) Ring gland z section of a *sal-Gal4 UAS-RFP, svp-lacZ* embryo stained with red fluorescent protein (RFP), anti- β -Gal, and *FasII*. Images from this series were used for the reconstruction shown in (A). White scale bar represents 50 μ m; yellow scale bars represent 10 μ m.

abdominal-A (*abd-A*), or *Abdominal-B* (*Abd-B*) restored *vvl1+2* expression in the Mx and Lb, but these cells formed tubes instead of migratory gland primordia (Figures 3L–3O; Figure S3). These cephalic tubes are trachea, as they do not activate *sna-rg* (Figure S3E'), they express *Trh*, and their nuclei accumulate Tango (Tgo), a maternal protein that is only translocated to the nucleus in salivary glands and tracheal cells [23], indicating that the trunk Hox proteins can restore *vvl* expression in the Mx and Lb but induce their transformation to trachea.

To investigate whether *vvl* and *trh* expression is normally under Hox control in the trunk, we focused on *Antp*, which is expressed at high levels in the tracheal pits (Figure S3J). In double-mutant *Dfd, Antp* embryos (Figures S3K and S3K'), *vvl1+2* was maintained in the Lb where *Scr* was present, while the Mx, T1, and T2 patches were missing. In T3–A8, *vvl1+2* expression, although reduced, was present, probably due to the expression of *Ubx*, *Abd-A*, and *Abd-B* in the posterior thorax and abdomen. Thus, *Antp* regulates *vvl* expression in the tracheal T2 primordium. Surprisingly, in *Dfd, Antp* double mutants, *Trh* and Tgo were maintained in the T2 tracheal pit (Figure S3K), indicating that although Hox genes can activate ectopic *trh* expression, in the tracheal primordia they may be acting redundantly with some other unidentified factor, explaining why the capacity of Hox proteins to specify trachea had not been reported previously.

We studied *sna* null mutants to determine *sna*'s requirement for ring gland development, but their aberrant gastrulation [24, 25] precluded analyzing specific ring gland defects. To investigate *sna* function in the gland primordia, we rescued the *sna* mutants with the *sna-squish* BAC [16], which drives normal *Sna* expression except in the ring gland (Figure S1B). These embryos have a normal gastrulation and activate the *sna-rg-GFP*; however, the gland primordia degenerate and disappear (Figure 4B). To block apoptosis, we made these embryos homozygous for the *H99* deficiency, which removes three apoptotic inducers [26]. In this situation, the ca and pg

primordia invaginated and survived, but they did not undergo EMT (Figure 4C). As a result, the gland primordia maintain epithelial polarity, do not migrate, and form small pouches that remain attached to the epidermis (Figure 4D).

Vvl is required for tracheal migration [8, 9, 27]. In *vvl* mutant embryos, *sna-rg-GFP* expression was activated, but the cells degenerated (Figure 4E). In *vvl* mutant embryos also mutant for *H99*, the primordia underwent EMT and migrated up to the primordia coalescence; however, the later dorsal migration did not progress (Figures 4F and 4G).

We have shown that the ca and pg develop from *vvl*-expressing cephalic cells at positions where other segments form trachea, suggesting that they could be part of a segmentally repeated structure that is modified in each segment by the activity of different Hox proteins. As the cephalic primordia are transformed into trachea by ectopic expression of trunk Hox (Figures 3L–3N), we tested whether the trachea primordia could form gland cells. Ectopic expression of *Dfd* with *arm-Gal4* resulted in the activation of *sna-rg-GFP* on the ventral side of the tracheal pits (data not shown). These *sna-rg-GFP*-expressing cells also expressed *vvl1+2* and *Trh* and had nuclear Tgo, showing that they conserve tracheal characteristics. These *sna-rg-GFP*-positive cells did not show EMT and remained associated to the ventral anterior tracheal branch. The strength of ectopic *sna-rg-GFP* expression increased when ectopic *Dfd* was induced in *trh* mutant embryos (Figure 3P). However, migratory behaviors in the *sna-rg-GFP* cells were only observed if *Dfd* was coexpressed with *Sal* (Figures 3Q–3T). Thus, *sal* is expressed several times in the gland primordia, first at st9–10 repressing trunk Hox expression in the cephalic segments (Figure S3G) and second from st11 in the prothoracic gland. It is uncertain whether the *sal* requirement for migration is linked to the first function or whether it represents an additional role.

Our results show that the endocrine ectodermal glands and the respiratory trachea develop as serially homologous organs in *Drosophila*. The identical regulation of *vvl* in the primordia of

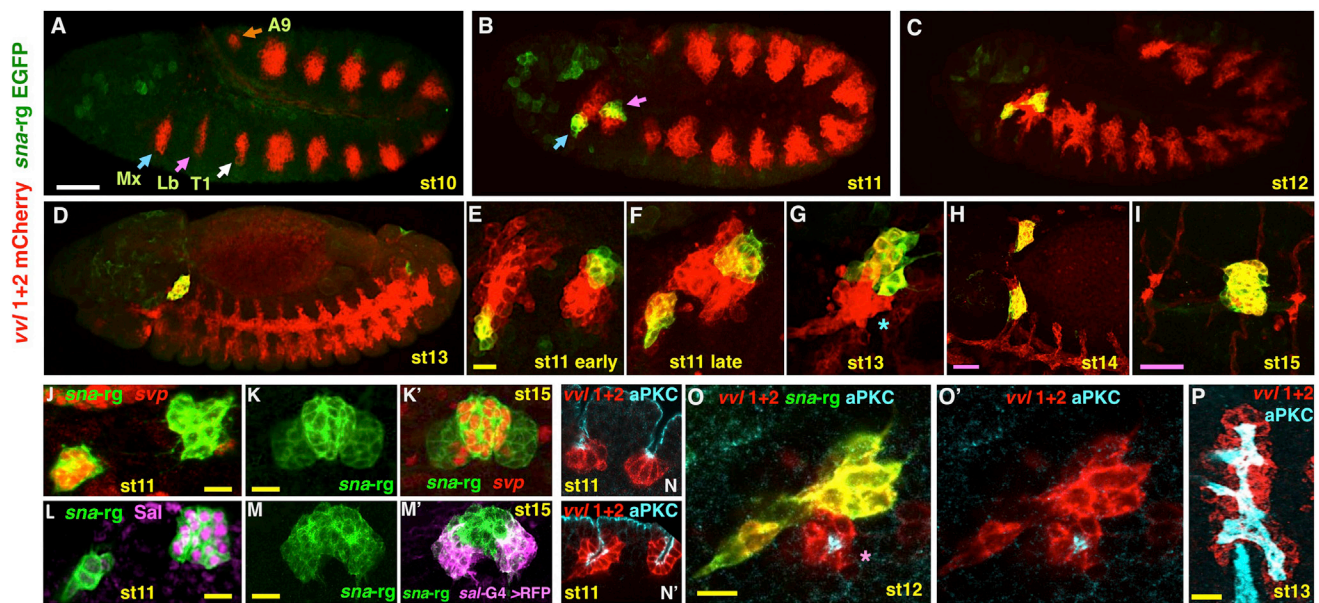


Figure 2. Formation of the Corpora Allata, Prothoracic Glands, and Tracheae

(A–I) Embryos double stained to detect *vvl1+2-mCherry* marking gland and trachea (red) and *sna-rg-EGFP* (green) marking the corpora allata and prothoracic glands.

(A) Early st10 embryos express *vvl1+2* in a segmentally repeated pattern.

(B) In st11 embryos, *vvl1+2* cells invaginate in all segments except T1 and A9. In the maxilla (Mx) and labium (Lb), a subgroup of *vvl1+2* cells activate *sna-rg-EGFP*.

(C) Tracheal primordia from T2 to A8 start branching at the time when the *sna-rg-EGFP* cells experience the epithelial-mesenchymal transition.

(D) Dorsal migration of the coalesced ca/pg primordium. All migrating cells express *sna-rg-EGFP*, while non-Snail-expressing *vvl1+2* cells stay behind.

(E–G) Close-up of the Mx and Lb segments before (E and F) and after (G) the two gland primordia coalesce. Note that there are two different coalescence processes: one at st11, when the *vvl1+2*-expressing cells invaginating from the Mx and Lb come together (F), and another at st13, when the migrating *sna-rg-EGFP* cells coalesce (G).

(H) Dorsal view of *sna-rg-EGFP* cells at the time when the prothoracic glands meet the corpora cardiaca (unstained in this figure).

(I) Dorsal view of the ring gland as the contralateral corpora allata primordia fuse (comparable frontal view in Figures 1F and 1G).

(J–M) Specification of the corpora allata and prothoracic glands.

(J–K') *svp-lacZ*, *sna-rg-EGFP* embryos double stained with anti- β -Gal and anti-GFP show that the corpora allata is specified in the Mx prior to coalescence and maintains *svp* expression until the ring gland is formed (K and K').

(L) *sna-rg-EGFP* cells double stained using anti-Spalt to show that the prothoracic gland is specified in the Lb before coalescence.

(M and M') Embryo expressing *sal-Gal4*, showing that this line drives expression specifically in the prothoracic gland.

(N and N') Embryos double stained for *vvl1+2* and aPKC show that both the gland primordia (N) and the trachea primordia (N') maintain epithelial polarity during invagination.

(O and O') In the Mx and Lb segments, only *vvl1+2* cells expressing *sna-rg-EGFP* experience epithelial-mesenchymal transition (EMT) and lose apical aPKC; in contrast, *vvl1+2* cells never lose apical polarity in the trachea (P).

Asterisk in (G) and (O) labels *vvl1+2* cells that do not activate *sna* and maintain epithelial characteristics. White scale bar represents 50 μ m; yellow scale bars represent 10 μ m; purple scale bars represent 25 μ m. See also Figure S1 and Movies S1 and S2.

trachea and gland by the combined action of the JAK/STAT pathway [13, 28] and Hox proteins (Figure 3; Figures S3 and S4) could represent the vestiges of an ancestral regulatory network retained to specify these serially repeated structures, while the activation of *Sna* for gland development and *Trh* and *Tgo* for trachea formation could represent network modifications recruited later by specific Hox proteins during the functional specialization of each primordium (Figure 4H). This hypothesis or alternative possibilities should be confirmed by analyzing the expression of these gene networks in various arthropod species. The diversification of glands and respiratory organs must have occurred before the split of insects and crustaceans, as there is a correspondence between the endocrine glands in both classes, with the corpora cardiaca corresponding to the pericardial organ, the corpora allata to the mandibular organ, and the prothoracic gland to the Y gland [5, 29, 30]. Despite their divergent morphology, a correspondence between the insect trachea and the crustacean gills

can also be made, as both respiratory organs coexpress *vvl* and *trh* during their organogenesis [31]. Divergence between endocrine glands and respiratory organs may have occurred when the evolution of the arthropod exoskeleton required solving two simultaneous problems: the need to molt to allow growth, and the need for specialized organs for gas exchange.

Experimental Procedures

Constructs Generated for this Work

A polylinker with EcoRI and XbaI restriction sites at the ends was synthesized (Sigma) and digested with EcoRI and XbaI. A pCaSpeR.lacZ.NLS was digested with EcoRI and XbaI, releasing the polylinker, the *hs43* promoter, and the lacZ.NLS that was substituted with the new polylinker creating (pCaSpeR polylinker), where a PH membrane domain from phospholipase C δ digested with BamHI-XbaI was cloned creating (pCaSpeR-PH). Next, mCherry was PCR amplified from pCS2+ vector, with BamHI/BglII tailed primers. A sequenced mCherry PCR product was digested with BamHI-BglII and cloned into pCaSpeR-PH digested with BamHI

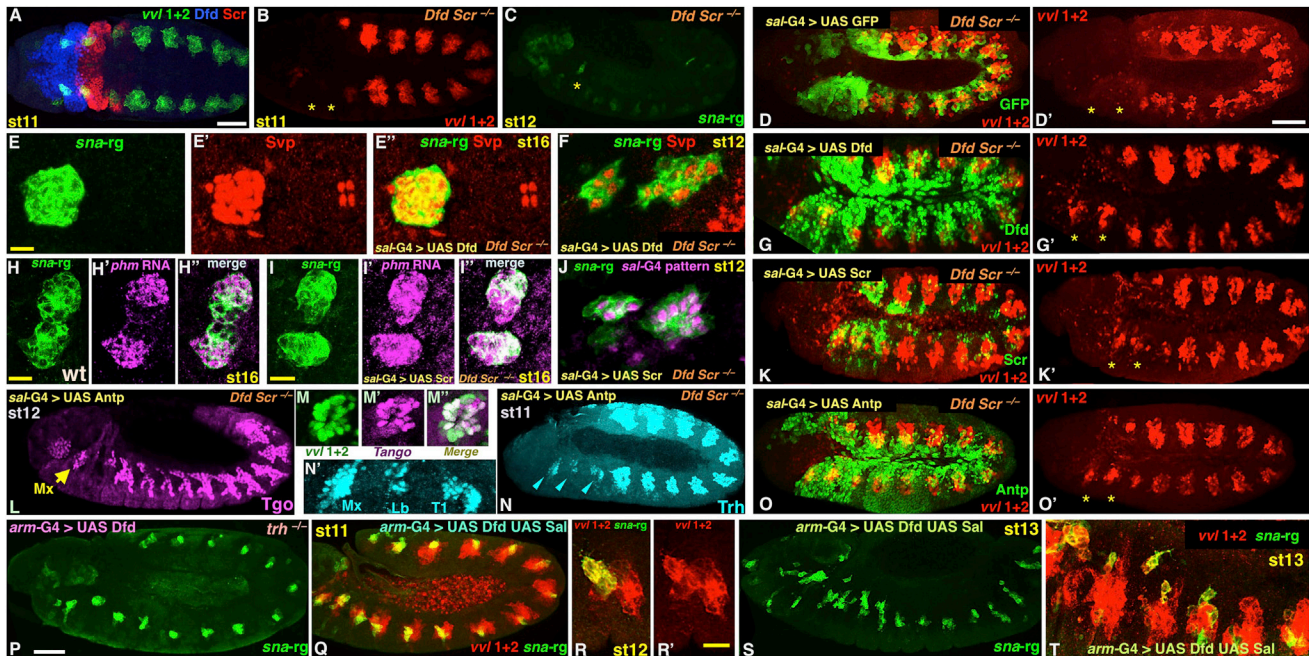


Figure 3. Hox Genes Control the Specification of Corpora Allata, Prothoracic Glands, and Trachea

(A) Ventral view of a *vvl1+2*-EGFP embryo stained with anti-Dfd (blue) and anti-Scr (red).
 (B and C) *Dfd*, *Scr* double-mutant embryos fail to activate *vvl1+2* in the Mx and Lb (B, asterisks) and have very low levels of *sna-rg* (C).
 (D, G, K, and O) *Dfd*, *Scr* double mutants expressing GFP or different Hox genes with the *sal-Gal4* line that drives early expression in the Mx, Lb, and T1 segments (D).
 (D and D') Expression of GFP does not rescue *vvl1+2* expression (red) in *Dfd*, *Scr* mutant embryos. Expression of *Dfd* (G), *Scr* (K), or *Antp* (O) rescues *vvl1+2* expression in both Mx and Lb (asterisks).
 (E and F) Embryos rescued with *Dfd* produce ring glands composed exclusively of corpora allata cells as judged by *Svp* expression.
 (H-H'') Wild-type ring glands express *phm* only in the subset of *sna-rg* cells forming the prothoracic gland.
 (I-I'') Embryos rescued with *Scr* produce ring glands composed exclusively of prothoracic gland cells as judged by *phm* or (J) *sal-Gal4* expression in all the *sna-rg* cells.
 (L) *Dfd*, *Scr* embryo rescued with *Antp* shows nuclear Tgo in the cephalic segments.
 (M-M'') Close-up of an embryo of the same genotype as in (L), showing that the *vvl1+2* primordium in the Mx is transformed toward trachea as it expresses Tango.
 (N and N'') *Dfd*, *Scr* embryo rescued with *Antp* induces expression of *Trh* in the head, indicating that they are forming trachea.
 (P) Ectopic expression of *Dfd* in the ectoderm using the *arm-Gal4* line induces robust expression of *sna-rg*-EGFP in the trunk segments of *trh* mutant embryos.
 (Q-T) Embryos labeled with *vvl1+2* mCherry and expressing *Dfd* and *Sal* with the *arm-Gal4* line induce expression of *sna-rg*-EGFP in a ventral subset of *vvl1+2* cells (Q); the *sna-rg*-EGFP cells become motile (R and R'), migrating dorsally (S and T).
 Note that despite the UAS-*Scr* line (K) expressing lower amounts of protein than other Hox lines used (G and O), these are sufficient to rescue *vvl1+2* expression. White scale bars represent 50 μ m; yellow scale bars represent 10 μ m. See also Figures S2-S4.

(restriction site included in polylinker). Next, the *hs43* promoter digested with BamHI-BglII from pCaSpeR-NLS-LacZ was cloned into BamHI, completing the plasmid pCaSpeR-mCherry-PH.

pCaSpeR-EGFP-PH was constructed in a similar manner using EGFP from the pCS2+ vector to create a pCaSpeR-EGFP-PH plasmid.

The *sna-rg* enhancer was amplified by PCR from *Drosophila* genomic DNA and cloned into pGEMTeasy using the following primers: upper *sna-rg* primer: 5'-ACCAAACCAAGTCCAGACC-3'; lower *sna-rg* primer: 5'-GCTTGGGTTTTTCGTTTCAG-3'.

Finally, the enhancer was subcloned into pCaSpeR-EGFP-PH to create a reporter plasmid. The *vvl1+2* enhancer [13] was cloned from pGEMT-easy to pCaSpeR-mCherry-PH and pCaSpeR-EGFP-PH reporter plasmids. Both plasmids were transformed into *Drosophila* by the *Drosophila* Consolider-Ingenio 2007 transformation platform (CBM-SO, Universidad Aut3noma de Madrid).

Fly Stocks

The following mutant alleles and transgenic lines from the Bloomington *Drosophila* Stock Center were used: *Dfd*⁴, *Dfd*¹⁶, *Scr*⁴, *Df(3L)H99*; *Df(1)os1A*; *Dfd*¹⁶, *Antp*⁷; *P(HZ)svp*³, *vvl*^{GAS}, *trh*⁸; *sna*¹, *sna*¹⁸; *P[UAS-Dfd.B]W4*; *P[UAS-Scr.M]EE2*; *P[UAS-Antp.Mb]W1*; *P[UAS-myr-mRFP]*. UAS-*sal* and *Df(2)5 sal* were obtained from R. Barrio, and the *phm-GAL4>CD8::GFP* line [32] was obtained from M. Mil3n. The *sna-lacZ* 6 kb reporter and *sna-GFP* BAC collection were obtained from A. Stathopoulos and M. Levine. The following stocks from our laboratory were used: UAS-

Ubx; UAS-*AbdBm* [33]; the reporter *vvl1+2-lacZ*; and the enhancer trap lines *sal-GAL4* 459.2 and *arm-Gal4* (Bloomington stock number 1560).

Primary Antibodies

The following primary antibodies were used: chicken anti-GFP (Abcam), rabbit anti-GFP (Invitrogen), rat anti-RFP (Chromotek), rabbit or mouse anti- β -Gal (Promega), chicken anti- β -Gal (Abcam), rat anti-Trh (J. Casanova), rabbit anti-Sal (R. Barrio), rabbit anti-Svp (R. Cripps), rabbit anti-aPKC (Santa Cruz), rabbit anti-Dfd (T. Kaufman), anti-DIG-AP (Roche), mouse anti-Tgo (Developmental Studies Hybridoma Bank), mouse anti-Fas II, mouse anti-Scr, mouse anti-AbdB, mouse anti-Ubx (FP3.38), and mouse anti-Antp.

Secondary Antibodies

The following Invitrogen antibodies were used: anti-mouse A488, anti-mouse A555, anti-mouse A647, anti-chicken A488, anti-goat A647, anti-rabbit A488, anti-rabbit A555, anti-rabbit A647, and anti-rat A555.

RNA Probes

The in situ RNA probes *snail* RE35237 and *phantom* RE03155 were used. Riboprobes were generated using a DIG RNA Labeling Kit (Roche).

Microscopy

In vivo time-lapse microscopy was performed using a Leica DMI 6000 SP5 MP-AOBS inverted confocal microscope. A Leica SPE confocal microscope

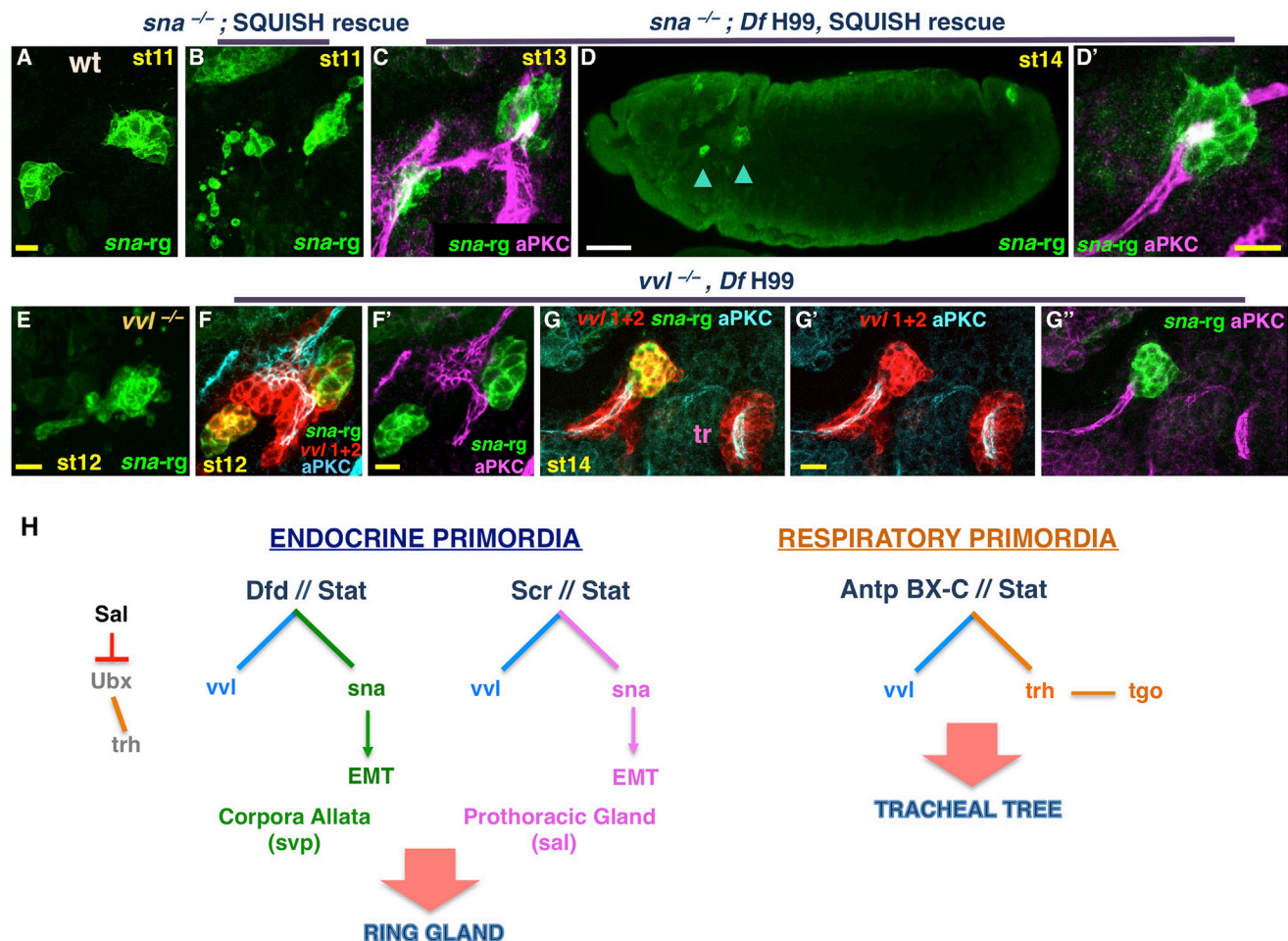


Figure 4. Function of Sna and Vvl in the Ring Gland

(A) Wild-type ca and pg primordia labeled with *sna-rg-GFP* at st11.

(B) The ca and pg become apoptotic and disintegrate when *sna* is removed specifically from the primordia.

(C) When apoptosis is blocked from ca and pg primordia that do not express Sna, the cells do not go into EMT and remain attached to the surface without losing apical aPKC (purple).

(D) ca and pg primordia not expressing Sna do not migrate, and the primordia remain separated at late stages.

(D') Close-up of the pg in (D), showing that the primordium's apical side integrates with the neighboring epithelial cells.

(E) In *vvl* mutant embryos, the ring gland primordia also become apoptotic.

(F and G) *vvl* mutant embryos in which apoptosis is prevented by the deletion of the apoptotic inducers. The ca and pg invaginate and go into EMT, losing apical aPKC. Although both primordia coalesce (G), dorsal migration does not progress.

(H) Schematic representation of the early ectodermal endocrine and respiratory primordia specification gene network. In both networks, Hox and STAT induce the expression of the early transcription factors. While all Hox genes can induce *vvl* expression, only Dfd and Scr induce *sna* expression, while trunk Hox genes induce Trachealess expression. Sal represses trunk Hox expression in the head (H), preventing *trh* expression.

White scale bar represents 50 μ m; yellow scale bars represent 10 μ m. See also Figure S4.

was used for multiple antibody stainings and in situ/antibody stainings. Images were processed using ImageJ and Imaris (7.6).

Supplemental Information

Supplemental Information includes four figures and two movies and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2013.11.010>.

Acknowledgments

We thank M. Averof, J. Casanova, J. Culi, B. Denholm, J.R. Martínez-Morales, and E. Sánchez-Herrero for critical reading of the manuscript and R. Barrio, J. Casanova, R.M. Cripps, T.C. Kaufman, M. Levine, and A. Stathopoulos for antibodies and reagents. C.S.-H. holds an FPI student-ship from MICINN. S.S. is a Ramón y Cajal Fellow. This work was supported by grants of the Programa Consolider, the Junta de Andalucía, and the Spanish MICINN/FEDER to J.C.-G.H.

Received: October 1, 2013

Revised: November 1, 2013

Accepted: November 1, 2013

Published: December 12, 2013

References

1. Davis, G.K., and Patel, N.H. (1999). The origin and evolution of segmentation. *Trends Cell Biol.* 9, M68–M72.
2. Hueber, S.D., and Lohmann, I. (2008). Shaping segments: Hox gene function in the genomic age. *Bioessays* 30, 965–979.
3. Ghabrial, A., Luschig, S., Metzstein, M.M., and Krasnow, M.A. (2003). Branching morphogenesis of the *Drosophila* tracheal system. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19, 623–647.
4. Manning, G., and Krasnow, M.A. (1993). Development of the *Drosophila* tracheal system. In *The Development of Drosophila melanogaster*,

- M. Bate and A. Martínez Arias, eds. (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 609–685.
5. Hartenstein, V. (2006). The neuroendocrine system of invertebrates: a developmental and evolutionary perspective. *J. Endocrinol.* 190, 555–570.
 6. De Velasco, B., Shen, J., Go, S., and Hartenstein, V. (2004). Embryonic development of the *Drosophila* corpus cardiacum, a neuroendocrine gland with similarity to the vertebrate pituitary, is controlled by sine oculis and glass. *Dev. Biol.* 274, 280–294.
 7. Park, S., Bustamante, E.L., Antonova, J., McLean, G.W., and Kim, S.K. (2011). Specification of *Drosophila* corpora cardiaca neuroendocrine cells from mesoderm is regulated by Notch signaling. *PLoS Genet.* 7, e1002241.
 8. Anderson, M.G., Perkins, G.L., Chittick, P., Shrigley, R.J., and Johnson, W.A. (1995). drifter, a *Drosophila* POU-domain transcription factor, is required for correct differentiation and migration of tracheal cells and midline glia. *Genes Dev.* 9, 123–137.
 9. de Celis, J.F., Llimargas, M., and Casanova, J. (1995). Ventral veinless, the gene encoding the C11a transcription factor, links positional information and cell differentiation during embryonic and imaginal development in *Drosophila melanogaster*. *Development* 121, 3405–3416.
 10. Isaac, D.D., and Andrew, D.J. (1996). Tubulogenesis in *Drosophila*: a requirement for the trachealess gene product. *Genes Dev.* 10, 103–117.
 11. Wilk, R., Weizman, I., and Shilo, B.Z. (1996). trachealess encodes a bHLH-PAS protein that is an inducer of tracheal cell fates in *Drosophila*. *Genes Dev.* 10, 93–102.
 12. Kerman, B.E., Cheshire, A.M., and Andrew, D.J. (2006). From fate to function: the *Drosophila* trachea and salivary gland as models for tubulogenesis. *Differentiation* 74, 326–348.
 13. Sotillos, S., Espinosa-Vázquez, J.M., Foglia, F., Hu, N., and Hombria, J.C. (2010). An efficient approach to isolate STAT regulated enhancers uncovers STAT92E fundamental role in *Drosophila* tracheal development. *Dev. Biol.* 340, 571–582.
 14. Boubé, M., Llimargas, M., and Casanova, J. (2000). Cross-regulatory interactions among tracheal genes support a co-operative model for the induction of tracheal fates in the *Drosophila* embryo. *Mech. Dev.* 91, 271–278.
 15. Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y., and Nieto, M.A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871–890.
 16. Dunipace, L., Ozdemir, A., and Stathopoulos, A. (2011). Complex interactions between cis-regulatory modules in native conformation are critical for *Drosophila* snail expression. *Development* 138, 4075–4084.
 17. Ip, Y.T., Park, R.E., Kosman, D., Yazdanbakhsh, K., and Levine, M. (1992). dorsal-twist interactions establish snail expression in the presumptive mesoderm of the *Drosophila* embryo. *Genes Dev.* 6, 1518–1530.
 18. Perry, M.W., Boettiger, A.N., Bothma, J.P., and Levine, M. (2010). Shadow enhancers foster robustness of *Drosophila* gastrulation. *Curr. Biol.* 20, 1562–1567.
 19. Barrio, R., de Celis, J.F., Bolshakov, S., and Kafatos, F.C. (1999). Identification of regulatory regions driving the expression of the *Drosophila* spalt complex at different developmental stages. *Dev. Biol.* 215, 33–47.
 20. Ryan, K.M., Hoshizaki, D.K., and Cripps, R.M. (2005). Homeotic selector genes control the patterning of seven-up expressing cells in the *Drosophila* dorsal vessel. *Mech. Dev.* 122, 1023–1033.
 21. Pearson, J.C., Lemons, D., and McGinnis, W. (2005). Modulating Hox gene functions during animal body patterning. *Nat. Rev. Genet.* 6, 893–904.
 22. Warren, J.T., Petryk, A., Marqués, G., Parvy, J.P., Shinoda, T., Itoyama, K., Kobayashi, J., Jarcho, M., Li, Y., O'Connor, M.B., et al. (2004). Phantom encodes the 25-hydroxylase of *Drosophila melanogaster* and *Bombyx mori*: a P450 enzyme critical in ecdysone biosynthesis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 991–1010.
 23. Ward, M.P., Mosher, J.T., and Crews, S.T. (1998). Regulation of bHLH-PAS protein subcellular localization during *Drosophila* embryogenesis. *Development* 125, 1599–1608.
 24. Alberga, A., Boulay, J.L., Kempe, E., Dennefeld, C., and Haenlin, M. (1991). The snail gene required for mesoderm formation in *Drosophila* is expressed dynamically in derivatives of all three germ layers. *Development* 111, 983–992.
 25. Grau, Y., Carteret, C., and Simpson, P. (1984). Mutations and Chromosomal Rearrangements Affecting the Expression of Snail, a Gene Involved in Embryonic Patterning in *DROSOPHILA MELANOGASTER*. *Genetics* 108, 347–360.
 26. White, K., Grether, M.E., Abrams, J.M., Young, L., Farrell, K., and Steller, H. (1994). Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*. *Science* 264, 677–683.
 27. Zelzer, E., and Shilo, B.Z. (2000). Interaction between the bHLH-PAS protein Trachealess and the POU-domain protein Drifter, specifies tracheal cell fates. *Mech. Dev.* 91, 163–173.
 28. Hombria, J.C., Brown, S., Häder, S., and Zeidler, M.P. (2005). Characterisation of Upd2, a *Drosophila* JAK/STAT pathway ligand. *Dev. Biol.* 288, 420–433.
 29. Chang, E.S., and O'Connor, J.D. (1977). Secretion of alpha-ecdysone by crab Y-organs in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 615–618.
 30. Laufer, H., Borst, D., Baker, F.C., Reuter, C.C., Tsai, L.W., Schooley, D.A., Carrasco, C., and Sinkus, M. (1987). Identification of a juvenile hormone-like compound in a crustacean. *Science* 235, 202–205.
 31. Franch-Marro, X., Martín, N., Averof, M., and Casanova, J. (2006). Association of tracheal placodes with leg primordia in *Drosophila* and implications for the origin of insect tracheal systems. *Development* 133, 785–790.
 32. Ono, H., Rewitz, K.F., Shinoda, T., Itoyama, K., Petryk, A., Rybczynski, R., Jarcho, M., Warren, J.T., Marqués, G., Shimell, M.J., et al. (2006). Spook and Spookier code for stage-specific components of the ecdysone biosynthetic pathway in *Diptera*. *Dev. Biol.* 298, 555–570.
 33. Castelli-Gair, J., Greig, S., Micklem, G., and Akam, M. (1994). Dissecting the temporal requirements for homeotic gene function. *Development* 120, 1983–1995.

Current Biology, Volume 23

Supplemental Information

**Common Origin of Insect Trachea
and Endocrine Organs**

from a Segmentally Repeated Precursor

Carlos Sánchez-Higueras, Sol Sotillos, and James Castelli-Gair Hombría

Supplemental Inventory

Figure S1, Related to Figure 2

Figure S2, Related to Figure 3

Figure S3, Related to Figure 3

Figure S4, Related to Figure 4

Movie S1, Related to Figure 2

Movie S2, Related to Figure 2

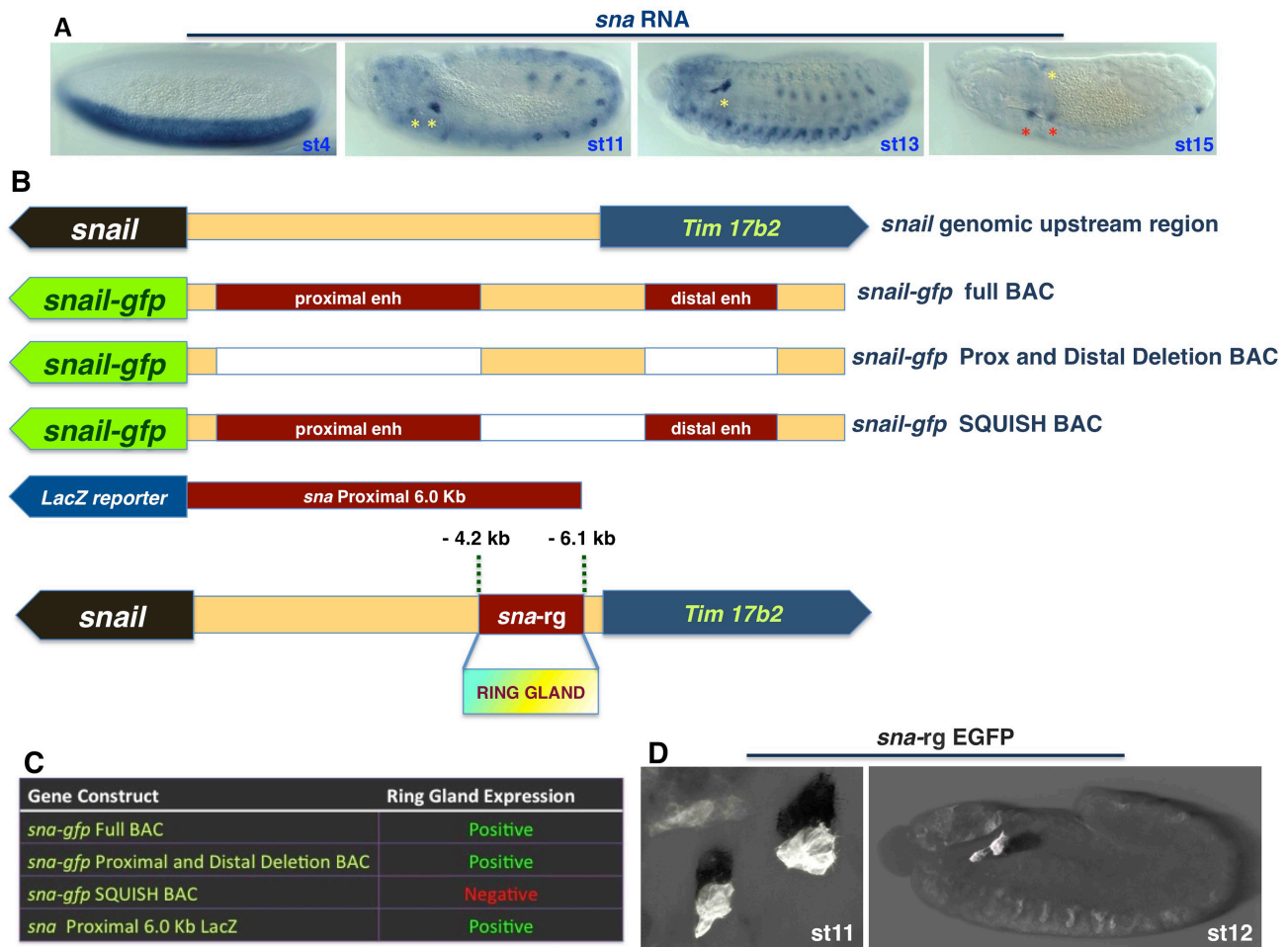


Figure S1. Related to Figure 2. *sna* expression in the corpora allata and prothoracic gland.

(A) *In situ* *sna* mRNA expression during embryogenesis. At blastoderm (st4) *sna* is activated in the mesoderm primordium, this expression soon disappears with *sna* becoming activated at st11 in specific cells including the ca and pg primordia (asterisks) before coalescence. Expression of *sna* is maintained during dorsal migration (st13) and ceases just before dorsal fusion (red asterisks show wing and haltere *sna* expression appearing as ring gland expression fades away at st15). Schematic representation of the genomic *sna* region including part of the neighbouring *Tim17b2* gene, and the constructs and BAC elements used to localize the *sna*-ring gland enhancer. (C) Summary of ring gland activity of the different constructs. The Full upstream BAC and the BAC element deleting both distal and proximal shadow mesoderm enhancers maintain ring gland expression. The *sna* SQUISH BAC lacks ring gland expression but is capable of rescuing the germ band abnormalities of *sna* null mutant embryos without rescuing *sna* function in the ring gland. These data and the expression of a 6kb *sna-lacZ* reporter gene in the ring gland primordia, locate the region controlling *sna* expression in the ring gland to a 1.9 kb fragment. (D) Expression of the *sna-rg* enhancer drives strong levels of EGFP in the corpora allata and the prothoracic glands from st11 up to larval stages.

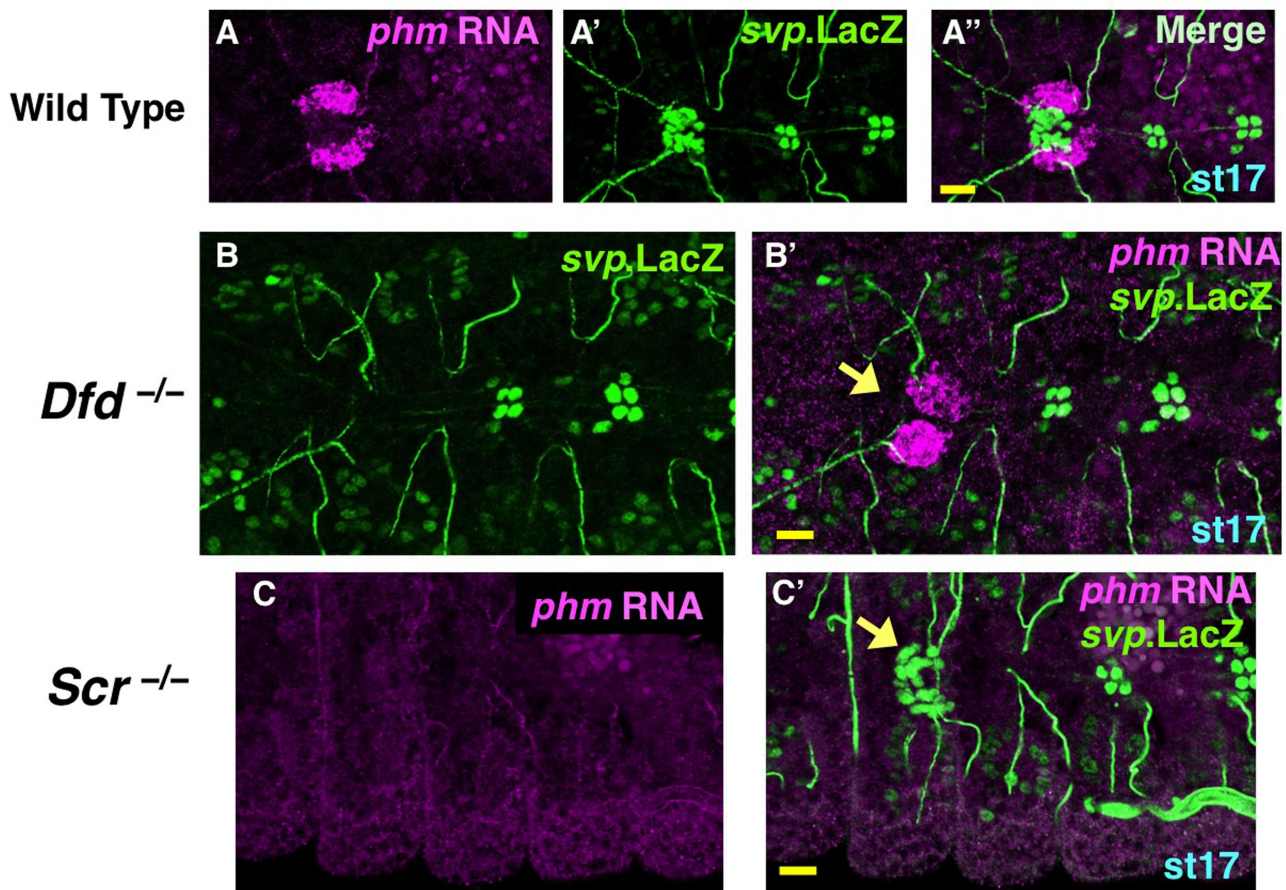


Figure S2. Related to Figure 3. Hox gene requirement for corpora allata and prothoracic gland development. Dorsal views of late *svp-lacZ* embryos stained with anti- β GAL (green) and a *phm* RNA probe (purple) to show the corpora allata and prothoracic gland in wild type (A), *Dfd* (B) or *Scr* mutant embryos (C). In the dorsal region focused here, *svp-lacZ* also labels four cardiomyocytes per segment in the aorta. In these stainings there is some unspecific labelling of the tracheal lumen. In *Dfd* mutants the corpora allata do not form (B) but the prothoracic glands (B') develop normally. In *Scr* mutants the prothoracic glands do not form (C) but the corpora allata reach their normal destination (C'). Yellow scale bars 10 μ m.

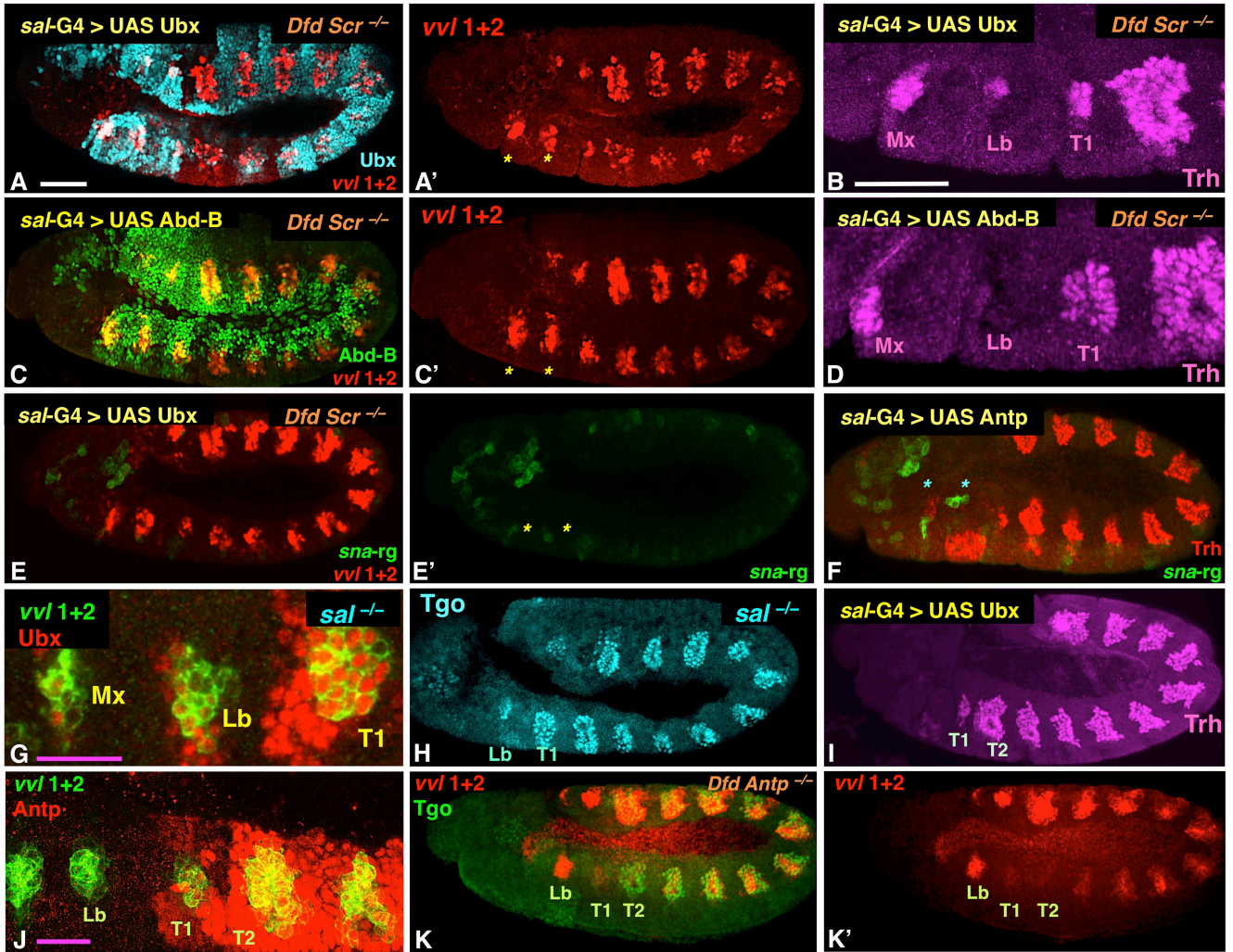


Figure S3. Related to Figure 3. Capacity of Hox genes to activate tracheal and ring gland markers. (A) In a *Dfd, Scr* double mutant embryo, ectopic expression of Ubx (blue) with a *sal-Gal4* line rescues expression of *vvl1+2* (red) in the Mx and Lb (asterisks in A') and also induces ectopic Trh expression (purple in the close up shown in B). (C) Ectopic Abd-B expression (green) also rescues *vvl1+2* expression (red in C and C') in the Mx and Lb (asterisks in C') and induces ectopic Trh expression (purple in D). (E) Ectopic Ubx expression rescues *vvl1+2* expression but does not induce *sna-rg-EGFP* (E' asterisks). (F) In a wild type embryo, ectopic Antp expressed with *sal-Gal4* induces anterior Trh expression in T1 and Mx but does not eliminate the *sna-rg* expression driven by cephalic Hox genes (asterisks). (G-H) In *sal* mutant embryos there is ectopic Ubx expression (G) correlating with the formation of ectopic trachea observed in these embryos as shown by nuclear Tgo localization (H). (I) Ectopic expression of Ubx with *sal-Gal4* induces trachea formation in T1 but not in the Mx and Lb segments probably due to endogenous *Dfd* and *Scr* expression in these segments (compare with B). (J) *vvl1+2-EGFP* embryos costained with Antp (red) show high Antp expression in the T2 tracheal pit and moderate levels in T1. (K-K') In *Dfd, Antp* double mutant embryos *vvl1+2* expression (red) is reduced from the Mx, T1 and T2 segments correlating with the domains where *Dfd* and *Antp* proteins should be expressed. High levels of *vvl1+2* expression are maintained in the Lb where *Scr* is expressed. Intermediate levels of *vvl1+2* expression are observed in T3-A5, which is the domain of Ubx and Abd-A expression. High levels of *vvl1+2* are present in the Abd-B expression domain. Tgo nuclear localization (green in K) is not affected in the T2 tracheal primordium despite the absence of Antp indicating that there is another mechanism to maintain Trh/Tgo expression in trunk segments besides the Hox proteins. White scale bars 50 μ m, purple scale bars 25 μ m.

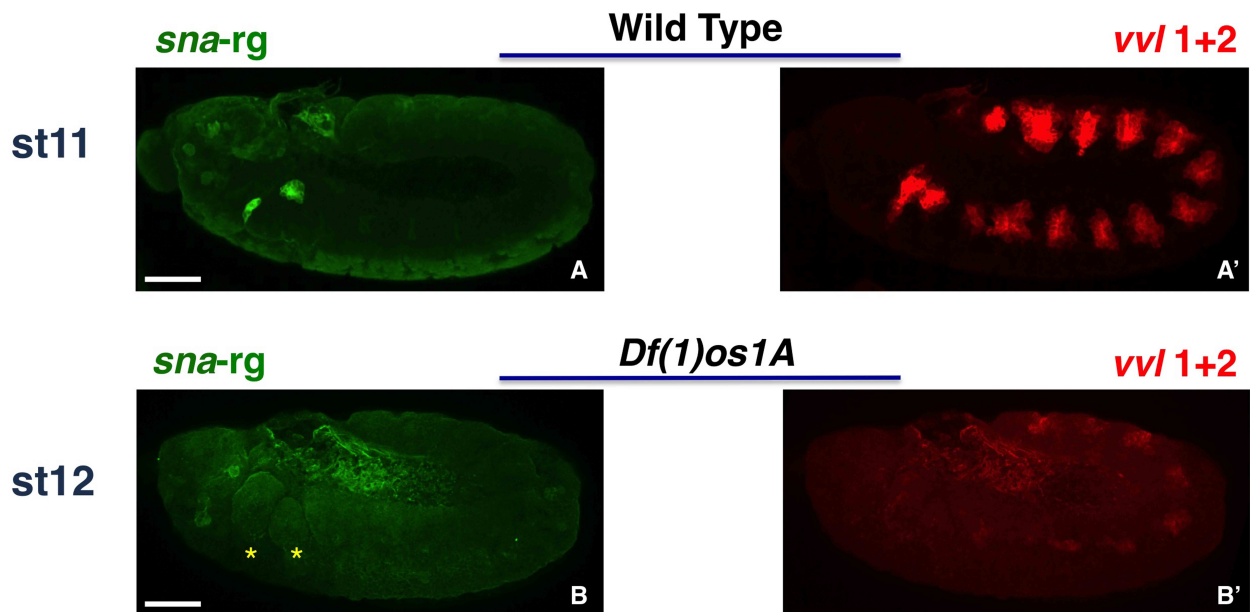


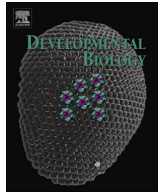
Figure S4. Related to Figure 4. JAK/STAT signalling requirement for *sna* and *vvl* expression in the ring gland and tracheae primordia. (A) Wild type embryo expressing *sna-rg* (green) and *vvl 1+2* (red in A'). (B) *Df(1)os1A* embryos lacking all three upd ligands required for JAK/STAT activation [33] show reduced *sna-rg* expression (asterisks in B) and *vvl 1+2* expression (red in B'). White scale bars 50 μ m.

Supplementary movie 1. Related to Figure 2. Primordia coalescence and dorsal migration.

Lateral view of st11 to st14 *sna-rg-EGFP* homozygous embryos showing the coalescence and dorsal migration of the corpora allata and the prothoracic gland. Scale bar 50 μ m.

Supplementary movie 2. Related to Figure 2. Ring gland dorsal fusion.

Dorsal view of st14 to st15 *sna-rg-EGFP* homozygous embryos showing the fusion of the contralateral corpora allata. Note the active formation of filopodia. Scale bar 10 μ m.



Precise long-range migration results from short-range stepwise migration during ring gland organogenesis

Carlos Sánchez-Higueras, James Castelli-Gair Hombria*

CABD, CSIC/JA/U. Pablo de Olavide, Carretera de Utrera Km1, Sevilla, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 February 2016

Received in revised form

4 April 2016

Accepted 4 April 2016

Available online 7 April 2016

Keywords:

Endocrine organ

Collective migration

Organogenesis

ABSTRACT

Many organs are specified far from the location they occupy when functional, having to migrate long distances through the heterogeneous and dynamic environment of the early embryo. We study the formation of the main *Drosophila* endocrine organ, the ring gland, as a new model to investigate *in vivo* the genetic regulation of collective cell migration. The ring gland results from the fusion of three independent gland primordia that migrate from the head towards the anterior aorta as the embryo is experiencing major morphogenetic movements. To complete their long-range migration, the glands extend filopodia moving sequentially towards a nearby intermediate target and from there to more distal ones. Thus, the apparent long-range migration is composed of several short-range migratory steps that facilitate reaching the final destination. We find that the target tissues react to the gland's proximity by sending filopodia towards it. Our finding of a succession of independent migration stages is consistent with the stepwise evolution of ring gland assembly and fits with the observed gland locations found in extant crustaceans, basal insects and flies.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Cell migration is pervasive throughout animal development. It can be observed at early gastrulation when extreme cell rearrangements transform the blastula into a multi-layered embryo and is also common during organogenesis, when the primordia of certain organs specified far from the location where they will function migrate across the embryo. Migration typically starts when cells experience an Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) detaching from the epithelium and becoming motile (Aman and Piotrowski, 2010; Friedl and Gilmour, 2009; Revenu and Gilmour, 2009; Rorth, 2009; Thiery et al., 2009). In some cases, as in the *Drosophila* haemocytes or the sea urchin larval skeleton precursors, the cells migrate almost independently of each other. In other cases the cells migrate collectively as in the *Drosophila* border cells or the fish lateral line primordium. These last two examples are excellent models to investigate collective cell migration because they move through a homogeneous environment, however at the same time this characteristic is rather unusual as cells normally migrate through a heterogeneous environment more similar to the one found by the germ cells or the neural crest cells. Here we show the *Drosophila* ring gland offers an ideal model to study collective cell migration through a heterogeneous and dynamic environment.

The ring gland is a complex organ formed by the association of three endocrine organs: the *corpora cardiaca* (CC) secreting hormones required for physiological homeostasis, the *corpora allata* (CA) secreting juvenile hormone, and the prothoracic glands (PG) secreting ecdysone required for moulting and metamorphosis. These three glands are specified in separate cephalic locations from where they migrate across several segments to converge in the dorsal region of the first abdominal segment (A1) where they organise as a ring around the anterior aorta (Fig. 1A and B). This long distance migration occurs in six hours from stage 11 (st11) to st16 at the moment when *Drosophila* embryogenesis is most active, experiencing the germ band retraction, the dorsal closure and the head involution movements as well as the organogenetic movements forming the trachea, the heart and the gut.

The CC originates medially in the anterior cephalic mesoderm from where it migrates between the brain lobes until it gets under the anterior aorta (Park et al., 2011). The CA and the PG originate respectively in the maxilla and the labium from ectodermal primordia located at homologous positions to those that in the posterior trunk segments form the trachea (Sanchez-Higueras et al., 2014). Similar to the tracheal cells, the CA and PG primordia invaginate at st10, but while the tracheal cells maintain their epithelial character during organogenesis, the CA and PG experience an EMT due to the transcriptional activation of *snail* (*sna*) regulated by a specific *sna* ring gland enhancer (*sna-rg*). A combination of the *sna-rg-mGFP* reporter that specifically labels

* Corresponding author.

E-mail address: jcashom@upo.es (J.-G. Hombria).

the CA and PG cells with the *glass-RFP* reporter that labels the CC allows studying the formation of the ring gland in vivo [Video 1 and Park et al. (2011), Sanchez-Higueras et al. (2014)]. Using these tools, we study how the gland primordia complete their long distance migration in such heterogeneous and extremely dynamic environment.

2. Materials and methods

2.1. Constructs

UAS-H2B-mCherry-P2A-eGFP-PH: A double-colour fluorescent reporter construct simultaneously labelling the cell nuclei and the plasma membrane was generated by cloning under a UAS promoter, the *Histone H2B-mCherry* and *eGFP-PH* genes separated by the P2A peptide (Kim et al., 2011). The *H2B-mCherry-P2A* coding sequence, cloned into pGEMT-easy, was amplified using a fwd H2B KpnI tailed primer and a rev P2A primer with 5' eGFP homology. *eGFP-PH* from the pCaSpeR-eGFP-PH reporter plasmid (Sanchez-Higueras et al., 2014), was amplified using a fwd eGFP primer with 5' P2A homology and a rev PH primer KpnI tailed. The Overlapping PCR was carried out by mixing the previously purified PCR amplicons together with the H2B and PH KpnI tailed primers. The *H2B-mCherry-P2A-eGFP-PH* overlapping PCR product was cloned into pGEMT-easy, sequenced, KpnI digested and subcloned into pUAST.

sna-rg-mCherry: The *snail-rg* enhancer was subcloned from pGEMT-easy to a pCaSpeR-mCherry-PH (Sanchez-Higueras et al., 2014) reporter plasmid.

Randomly inserted transgenics were obtained by injection at the *Drosophila Consolider-Ingenio 2007 transformation platform* (CBM-SO, Universidad Autónoma de Madrid).

2.2. Fly stocks

The following mutant alleles and transgenic lines were obtained from the Bloomington *Drosophila* Stock Center: *Dfd⁴*, *Dfd¹⁶*, *Scr⁴*; *trh⁸*; P{UAS-*Dfd.B*}W4; *h1^{AB42}*, P{UAS-*dAxi*-GFP}, P{UAS-*CD8-RFP*}, P{UAS-*LacZ*}, P{*HZ*}svp³. *hand-GFP*, *hand-Gal4* and *tin^{EC40}* were obtained from Mar Ruiz Gómez (Han et al., 2006); *twi-Gal4* and *twi-actin-GFP* from Mary Baylies; *unpg^{R37}* from Frank Hirth, UAS-*cad5/9* from Maria Leptin (Schafer et al., 2014); Glass-RFP from Seung K. Kim (Park et al., 2011) and *btl-moeRFP* and *btl-Gal4* from Sofia Araujo (Causinus et al., 2008). The following stocks from our laboratory were used: *snail-rg-eGFP*, *vvl1+2-mCherry*, *vvl1+2-lacZ*, *UAS-abdA* and *sal-GAL4* 459.2.

2.3. Immunostaining and RNA hybridization

Primary antibodies: chicken anti-GFP (1:800; Abcam; lot.nr.: GR53074-3), rabbit anti-GFP (1:100; Invitrogen; lot.nr.:1094358), rat anti-RFP (1:500; Chromotek 5F8; lot.nr.:140915), rabbit (1:1000; Cappel; lot.nr.:04623) or mouse anti-βGal (1:1000; Promega; lot.nr.:63535), chicken anti-β-Gal (1:500; Abcam; lot.nr.: gr81025-1), rabbit anti-Svp (1:100; Richard Cripps), anti-DIG-AP (1:1000; Roche; lot.nr.:13680323 Oct 2014), guinea pig anti-Odd (1:1000 from Casares' lab; originally from Hilde Jassens), and mouse anti-Tgo (1:50; 1ea 12/30/09), mouse anti-Fas III (1:50; 1ea 6/20/13) and mouse anti-FasII (1:50; 1ea 11/29/12) (Developmental Studies Hybridoma Bank).

Secondary antibodies: anti-mouse A488, A555 and A647; anti-chicken A488; anti-goat A647; anti-rabbit A488, A555 and A647; anti-guinea pig A488; and anti-rat A555 (All diluted 1:200; Invitrogen).

A phantom riboprobe was generated with RE03155 using a DIG RNA Labelling Kit (Roche).

2.4. Time-lapse recording, laser ablation and confocal imaging

In vivo time-lapse microscopy was performed using the inverted Leica DMI 6000 SP5 MP-AOBS or Olympus IX81 microscopes with a Roper Scientific Spinning Disk system. A Leica SPE confocal microscope was used for multiple antibody staining and RNA *in situ*/antibody staining. Images were processed using ImageJ and Imaris (7.6).

In vivo time-lapse and laser ablation was performed using an inverted microscope, Olympus IX81 Spinning Disk Roper Scientific system with a coupled laser module. The *iLas* software, was used to select specific embryonic areas to ablate them with a 355 nm pulsed laser. Between 15 and 20 laser-pulses were applied at full laser-power. Images were taken using a 40 × /1.15 w objective. For CC laser ablation n=2, anterior aorta laser ablation n=4.

3. Results

To discover the exact route followed by the ring gland primordia during migration, we double stained embryos carrying markers for various tissues and the *sna-rg* reporter that labels the *corpora allata* (CA) and prothoracic gland (PG) primordia [Sanchez-Higueras et al. (2014) and Section 2]. We found that the CA and PG migrate through the mesodermal cells just under the ectodermal epidermis (Fig. S1C–G). Although during migration the CA and the PG primordia extend filopodia in all directions, filopodia accumulate in certain areas including between the CA and the PG primordia prior to their coalescence and in a posterior dorsal direction to the PG (Fig. S1A and B). To find out where these filopodia are directed to, we double stained with various organ specific markers. Staining with the tracheal marker *btl-moeRFP* shows that the PG filopodia contact the cerebral branch (cb) formed by the second thoracic (T2) tracheal pit and that the cb reciprocally extends filopodia towards the PG (Figs. 1C, S1H and Videos 2, 3). Staining with the *hand-Gal4* line driving *UAS-nRFP-P2A-mGFP* (Section 2) to label the aorta and heart, shows that after coalescence, the CA/PG primordia extend filopodia towards the anterior aorta primordium that, in turn, extends filopodia towards the PG (Fig. S1J and K). The gland and aorta primordia approach, until at st13 they make an extensive contact that is maintained at later stages as the aorta moves during dorsal closure to join its contralateral primordium (Fig. S1L, M and Videos 4,5).

To clarify the temporal order of the interactions between these organs we performed triple stainings (Fig. 1C–H). We find that at early st12 the CA interacts with the PG as the PG is interacting with the cerebral tracheal branch. At this time the cerebral branch is also interacting with the aorta primordium (Fig. 1C). At late st12 when the CA has coalesced with the PG, the PG interacts simultaneously with the trachea and the aorta (Fig. 1D). Although the cerebral branch will maintain contact with the anterior aorta and the gland for the rest of development, its tip extends ahead and turns towards the brain (Fig. 1F,G Videos 6, 7). From st13 on, the glands are closely attached to the anterior aorta, following it as the aorta moves to complete dorsal closure (Figs. 1G, H and S1L, M). At st14, the beginning of head involution causes a re-organization of the anterior embryo, resulting in the anterior movement of the ectoderm, somatic muscles and dorsal trachea relative to the brain, cerebral branch, ring gland and dorsal vessel. As a result, when head involution ends at st16, the gland and the anterior aorta underlay the epidermis of the A1 segment (Fig. 1H and Videos 6, 7).

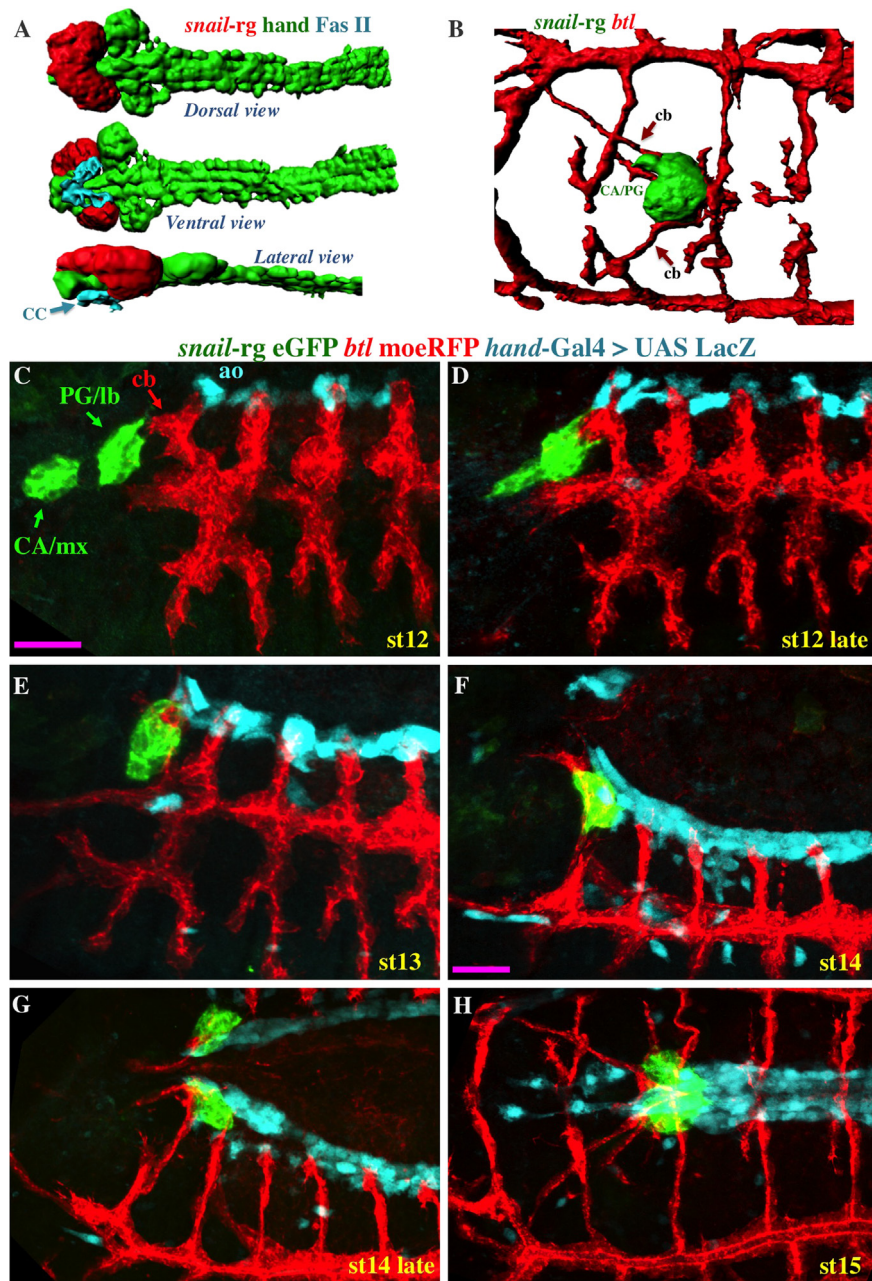


Fig. 1. Association of the ring gland primordia to the trachea and anterior aorta. (A) Dorsal, ventral and lateral views of a st16 embryo triple stained with *sna-rg-RFP* construct to label the CA and the PG (red), *FasII* to label the CC (blue) and *hand-GFP* (green) to label the lymph gland and the dorsal vessel. At the end of embryogenesis the ring gland encircles the anterior aorta abutting the lymph gland. (B) Dorsal view of a st16 embryo double stained with *sna-rg-GFP* (green) and *btl-moe-RFP* (red) showing the ring gland associated to the cerebral branch (cb). (C–H) Triple staining of the aorta (*hand-Gal4 > UAS-lacZ*, blue), the trachea (*btl-moe-RFP*, red) and the CA and PG (*sna-rg-mGFP*, green) at progressive stages of development as indicated in the panels. C–F lateral and G–H dorso-lateral images. Images in A and B are confocal stainings transformed with the Imaris program. In all images anterior is left, scale bar 25 μ m.

3.1. Requirement of surrounding tissues for ring gland migration

To find out if the *in vivo* interactions we observe are important for migration, we deleted the different organs using either mutations that abolish their formation or laser ablation and analysed the behaviour of the remaining gland elements.

To test the requirement of the *corpora cardiaca* for global ring gland migration we laser ablated it and analysed the dorsal migration of the other gland components labelling the CC with *glass-RFP* (Park et al., 2011) and the CA and PG with *sna-rg-mGFP*. Comparison of *in vivo* migration of wild type and

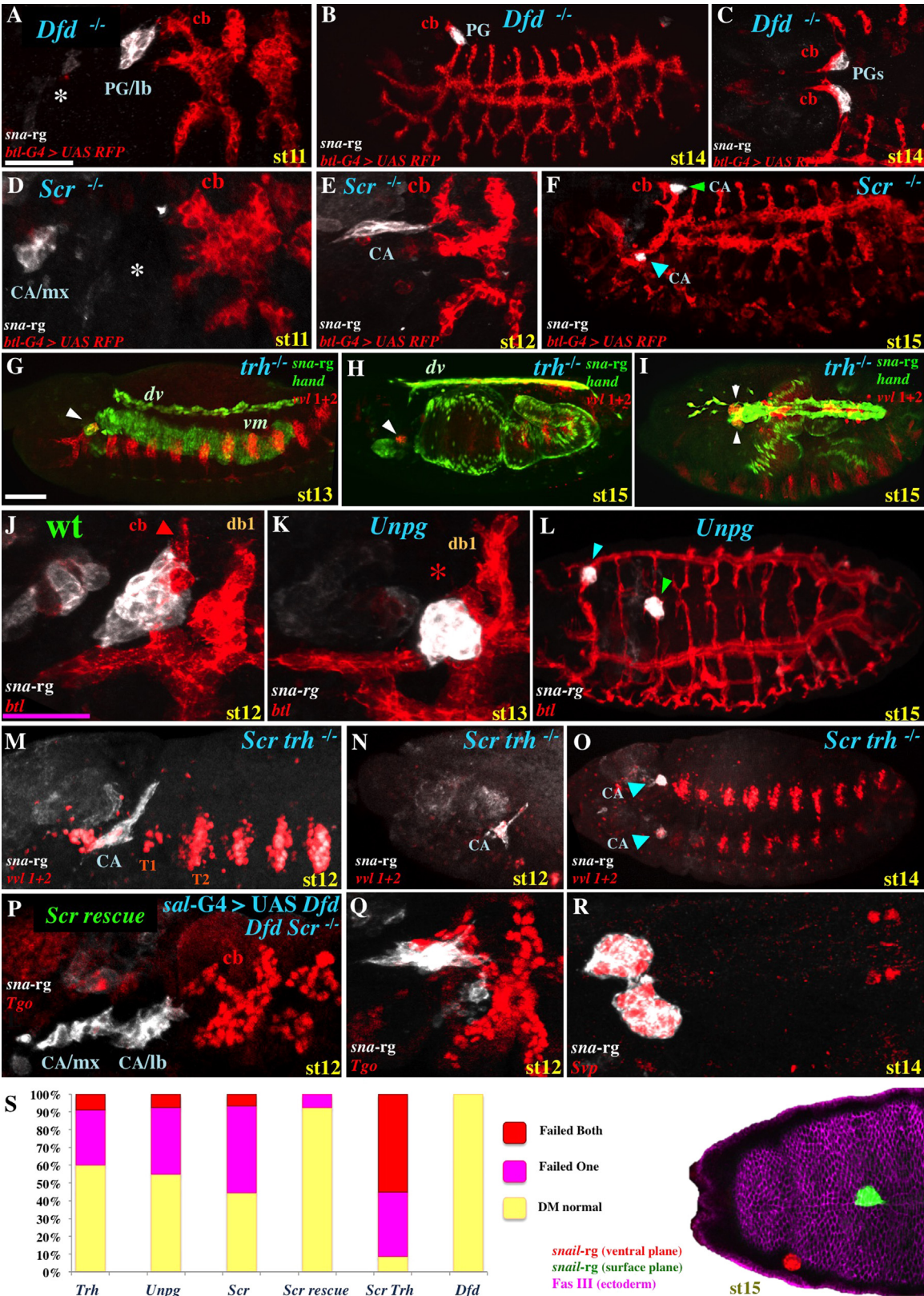
CC ablated embryos shows no major differences on the behaviour of the CA/PG primordia (Compare Videos 1 and 8).

Next we tested the requirement of the CA for global ring gland migration by studying *Deformed* (*Dfd*) mutant embryos where the CA is not formed [Fig. 2A and Sanchez-Higueras et al. (2014)]. We found that in all *Dfd* embryos the PG joins the CC and reaches its dorsal position (Fig. 2A–C, S). Thus, the PG and CC migration is independent of the presence of the ca.

The formation of the PG requires the activity of the *Sex combs reduced* (*Scr*) gene [Fig. 2D and Sanchez-Higueras et al. (2014)]. We found that in most *Scr* mutant embryos the CA reaches its dorsal

position, but in some cases the CA are found in abnormal locations (Fig. 2F). Quantification of the migration defects shows that both the left and right side CA migrate correctly in 45% of the embryos, while in 46% of the embryos either the left or the right side CA

become misplaced and in 9% of the embryos both primordia fail to migrate correctly (Fig. 2F and S). In the absence of the PG, the CA seems abnormally stretched in many cases (Fig. 2E), but when the CA reaches the cerebral branch the cb also extends filopodia



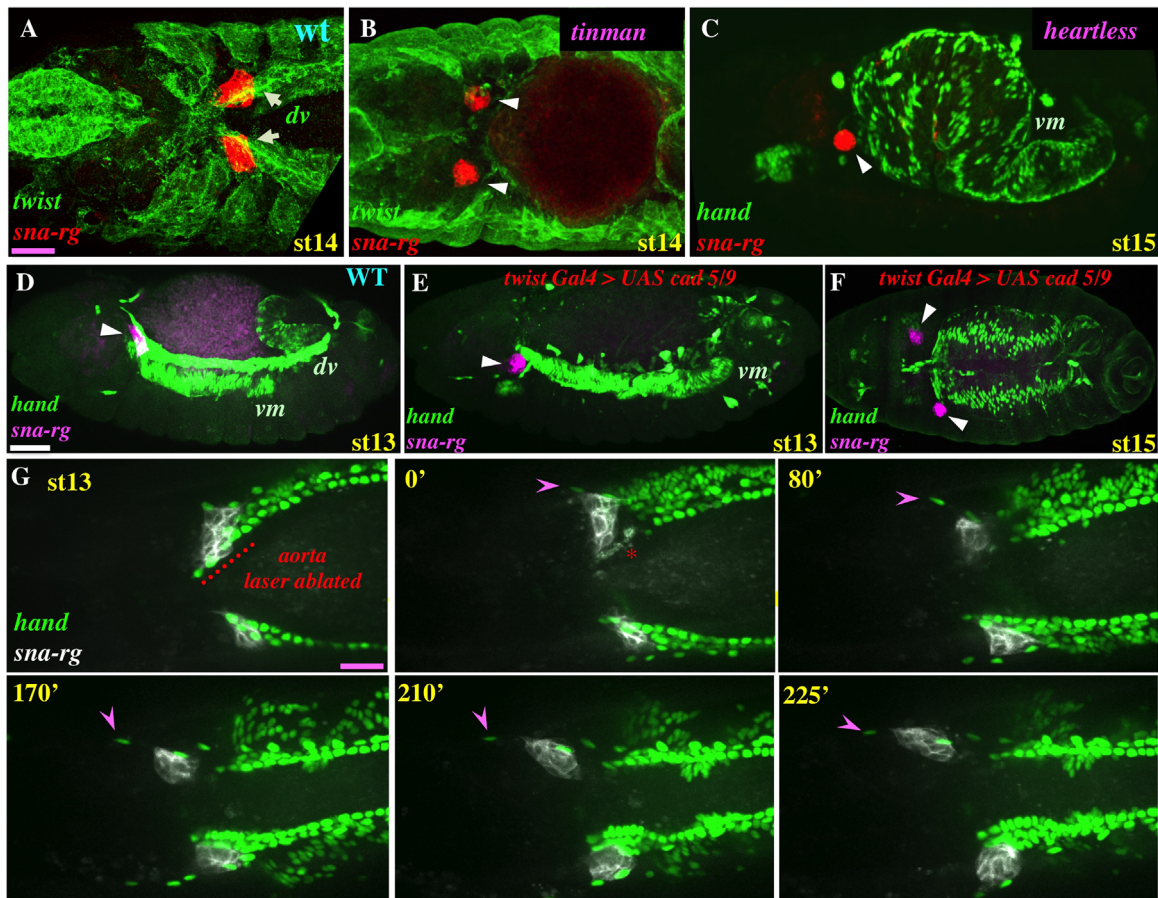


Fig. 3. Ring gland primordia migration in embryos with abnormal aorta. (A) *twi-act-GFP* st14 embryo with mesoderm derivatives labelled in green showing the ring glands (red) associated to the anterior end of the dorsal vessel primordium (dv). (B) Dorsal view of a *tin* mutant embryo that does not form a dorsal vessel and the ring glands round up in a ventral position. (C) Lateral view of a *heartless* mutant embryo where the dorsal vessel is not formed and the gland fails to migrate dorsally. (D) Lateral view of a *hand-GFP* embryo with the dorsal vessel (dv) and the visceral mesoderm (vm) labelled in green. Lateral (E) and dorsal (F) views of *twi-Gal4 > UAS-cad5/9* embryos where the dorsal vessel does not form due to Wnt signalling failure. The glands round up and do not migrate dorsally (white arrowheads). (G) Sequence of frames from Video 14 where the anterior aorta is laser ablated on one side. Prior to ablation the gland is following the anterior aorta during its dorsal closure movement. After ablation (0') the gland stops moving dorsally and follows the wing heart progenitors (purple arrowheads). White scale bar 50 μ m, purple scale bar 25 μ m.

towards the CA (Fig. 2E). Thus, the CA can complete its migration in the absence of the PG although less efficiently.

We then analysed gland migration in *trachealess* (*trh*) mutant embryos where the trachea do not form and the tracheal primordia remain in the ectoderm [Fig. 2G; Isaac and Andrew, 1996; Wilk et al., 1996]. Quantification shows that in 60% of the *trh* mutant embryos gland migration is normal, in 31% of the embryos either the left or the right primordium becomes misplaced

and in 9% of the embryos both primordia fail to migrate (Fig. 2H, I, and S). This shows that the tracheae are not absolutely required for gland migration but they contribute to migration efficiency. As we observe that the glands interact strongly with the cerebral branch (Fig. 2J), we analysed gland migration defects in *unplugged* (*unpg*) mutants where the cerebral branch stalls and does not extend dorsally while the rest of dorsal tracheal branches migrate correctly [Fig. 2K and Chiang et al. (1995)]. In 55% of the

Fig. 2. Migration of ring gland primordia in different mutant embryos. Embryos labelled with *sna-rGFP* to mark the CA and PG primordia and with either *btl-Gal4 > UAS-RFP*, Tango or *vv11 + 2-mCherry* to mark the trachea. In (G–I) the visceral mesoderm (vm) and the dorsal vessel (dv) are labelled with *hand-GFP* (green). (A–C) In *Dfd* mutants, where no CA forms in the maxilla (asterisk in A), the PG migrates correctly towards the dorsal position. (D–F) In *Scr* mutants where no PG forms in the labium (asterisk in D) the CA can migrate correctly towards the cerebral branch (E) and reach the dorsal position in many cases (green arrowhead in F) although a fraction of CA fail to migrate and remain in a ventral position (blue arrowhead in F). (G–I) In *trh* mutants where the tracheal branches do not invaginate (red patches in G), some ring glands fail to migrate dorsally (H) while others reach their dorsal target (I). (J) Close-up of a wild type embryo showing the CA/PG associated to the cerebral branch (cb) that migrates dorsally at a similar speed as the dorsal branch (db1). (K) Close-up of an *unpg* mutant embryo showing the CA/PG associated to a stunted cerebral branch (asterisk) that does not migrate dorsally compared to the dorsal branch (db1). All the tracheae shown in (J and K) derive from the most anterior tracheal pit formed in T2. (L) Dorsal view of an *unpg* mutant embryo where one primordium has reached its normal position (green arrowhead) while the other remains lateral (blue arrowhead). (M–O) Lateral view of *Scr*, *trh* double mutant embryos, showing a CA stretched towards the dorsal aorta. In most cases these primordia remain in lateral positions (blue arrowheads O). (P–R) *Dfd*, *Scr* double mutant carrying *sal-Gal4* and *UAS-Dfd* constructs. *Dfd* expression driven by *sal-Gal4* “rescues” the absence of glands inducing the formation of a CA in both maxilla and labium (P). In almost all cases, the maxillary CA coalesces with the labium's ectopic CA primordium. After contacting with the cerebral branch (Q), the CA reach a dorsal position (R). (R) Shows a dorsal view of an embryo where the contralateral CA labelled with *Svp* fuse. (S) Quantification of migration defects in the genotypes described above. Yellow bars represent embryos where both left and right glands migrate correctly, purple where only one migrates correctly and red where both fail to migrate. Embryos quantified varied between 50 and 55. In (S), the image to the right shows a dorsal and a ventro-lateral horizontal confocal section of the same embryo where the gland highlighted in green has reached the dorsal midline correctly but the contralateral gland (highlighted in red) has remained on a central-lateral position and is in a different focal plane. This embryo would be classified in the purple bar class. Tracheae are labelled in red with either *btl-Gal4 > UAS-RFP*, *vv11 + 2-RFP* or anti-Tango antibody (Tgo) as specified in the panels. White scale bar 50 μ m, purple scale bar 25 μ m.

unpg mutant embryos both glands reach the anterior aorta, in 37% of the cases either the left or the right primordium fails and in 8% of the cases both primordia fail to migrate (Fig. 2L–S). These data are similar to those of *trh* embryos, indicating that the cerebral branch is the main tracheal element contributing to efficient gland migration.

Finally, we studied gland migration in *tinman* (*tin*) and *heartless* (*htl*) mutant embryos where the aorta and the heart do not develop (Beiman et al., 1996; Bodmer, 1993; Bodmer et al., 1990; Gisselbrecht et al., 1996). We find that in all studied mutant embryos the CA/PG are never found dorsally, indicating that interaction with the anterior aorta is essential for gland dorsal migration (Fig. 3B and C).

3.2. Requirement of the dorsal vessel for ring gland migration

Although *tin* and *htl* mutants are required for the formation of the aorta and the heart (collectively known as dorsal vessel), these genes are also expressed in other mesoderm derivatives. To confirm that the migration defects we observe are specific, we used alternative methods to ablate the aorta.

The dorsal vessel is specified at st11 from mesodermal cells simultaneously receiving *dpp*/TGF β and *wingless*/Wnt signalling (Frasch, 1995; Park et al., 1996; Wu et al., 1995), while mesoderm cells receiving only *dpp* are specified as visceral mesoderm. Thus, interfering with *wg*/Wnt signalling in the mesoderm eliminates dorsal vessel formation specifically.

To block Wnt signalling we used two different approaches that interfere with the pathway's downstream transducer β -catenin/Armadillo (Clevers, 2006) and give identical results. It has been shown that overexpression of the E-cad construct *UAS-cad5/9* in the mesoderm with *twist-Gal4*, traps β -cat at the membrane and blocks dorsal vessel formation due to *wg* signalling inactivation (Schafer et al., 2014). Elimination of the aorta and heart development in this way stops the dorsal migration of the gland primordia that, compared to controls, will end in various positions inside the embryo (Fig. 3E, F and Videos 9, 10). Despite their abnormal location, these primordia are specified as glands as they activate *phantom* transcription, a gene encoding an enzyme necessary for ecdysone production (Warren et al., 2004), showing that the aorta interaction is necessary for gland migration but dispensable for PG specification (Fig. S2E and F). Similar gland migration defects were obtained when inactivating Wnt signalling by overexpressing *UAS-Axin* that degrades β -cat and abolishes dorsal vessel formation [Fig. S2G; Hamada et al., 1999].

We finally tested the effect of laser ablation of the anterior aorta on gland migration. To do this, we labelled with *sna-rg-mCherry* the gland primordia and with *hand-GFP* the dorsal vessel and the visceral mesoderm [Fig. 3G; Han and Olson, 2005]. Ablation of the anterior aorta was performed on a single side, serving the contralateral side as internal control. When the anterior aorta is ablated, the ring gland stops migrating dorsally and moves in different directions. In many cases the glands move towards the mesodermal cells forming the primordium of the adult wing heart. Wing heart cells originate in the embryo from the pericardial cells attached to the dorsal vessel. These cells separate from the pericardium and remain in the thoracic segments as the head involution movements relocate the dorsal vessel under A1 (Togel et al., 2008). In normal embryos the glands are attached to the anterior aorta and interact mildly with the wing heart cells (Fig. 1G,H and Fig. S1M Videos 11, 12), however, in the absence of the anterior aorta the ring gland shows affinity for the wing heart cells (Fig. 3G and Videos 13, 14).

Posterior to the ring gland and also attached to the anterior

aorta is the lymph gland, a mesodermal haemogenic organ formed around the anterior dorsal vessel (Fig. S2A). To test if the anterior aorta or the lymph gland, specifically induce the ring gland migration, we eliminated both structures by transforming them into homologous posterior abdominal structures by ectopically expressing the Hox gene *abdominal-A* (*abd-A*) in the mesoderm (Perrin et al., 2004). In these embryos where the anterior aorta is transformed into heart and the lymph gland into pericardial cells, we observe normal ring gland migration (Fig. S2A–D). Thus, the above experiments show that although in wild type embryos the anterior aorta is essential to direct dorsal gland migration, this capacity is also present in posterior dorsal vessel cells.

3.3. Contribution of intermediate landmarks for ring gland migration

While our experiments uncover an absolute requirement of the dorsal vessel for gland migration, they also show that the prothoracic gland and the cerebral branch are required for an efficient migration. We considered the possibility that the trachea and the prothoracic gland could act as intermediate landmarks facilitating migration through the large distance separating head from aorta. In this view the PG could help the CA to find the trachea and, in turn, the trachea could help the CA and the PG to find the aorta by bridging the distance between these organs (Figs. 1C and 4B). This would explain the inefficient migration observed when the PG or the cb are absent as due to the occasional failure of the primordia to localise the next landmark and reach the aorta.

To test this hypothesis we investigated gland migration after simultaneously removing two consecutive landmarks. For this purpose we analysed CA migration in a *Scr*, *trh* double mutant where the PG and the trachea are not formed. In *Scr*, *trh* double mutants there is an increase in gland migration failure with only in 9% of the embryos both glands reaching the anterior aorta, in 36% of the cases either the left or the right primordium fails and in 55% of the cases both primordia fail (Fig. 2M–O, S). Compared to migration failure in either single *Scr* or *trh* mutants, these data provide evidence that the absence of two intermediate landmarks increases the failure of CA migration towards the aorta in a super-additive manner.

To test if the position and nature of the intermediate stepping-stone is crucial, we analysed if an alternative intermediate landmark could compensate the absence of the normal one. To that end we tested if the CA migration defects observed in *Scr* mutants where the PG is not formed, could be rescued by inducing an ectopic CA in the labium to serve as alternative landmark. To do this we expressed in *Dfd*, *Scr* mutants *UAS-Dfd* with the *sal-Gal4* line. In these embryos the labium does not form a PG but instead forms an ectopic CA primordium that can interact with the CA formed in the maxilla [Fig. 2P and Sanchez-Higueras et al. (2014)]. Quantification of gland migration shows that in 91% of the embryos both primordia reach the dorsal side, in 9% of the cases either the left or the right primordium fails while we found no cases where both primordia failed (Fig. 2Q–S). These data show that the presence of an ectopic CA in the labium can substitute the absence of the PG, restoring the efficient migration of the maxillary CA.

4. Discussion

In this work we have analysed how the *Drosophila* ring gland is formed by three gland primordia migrating from the head to the

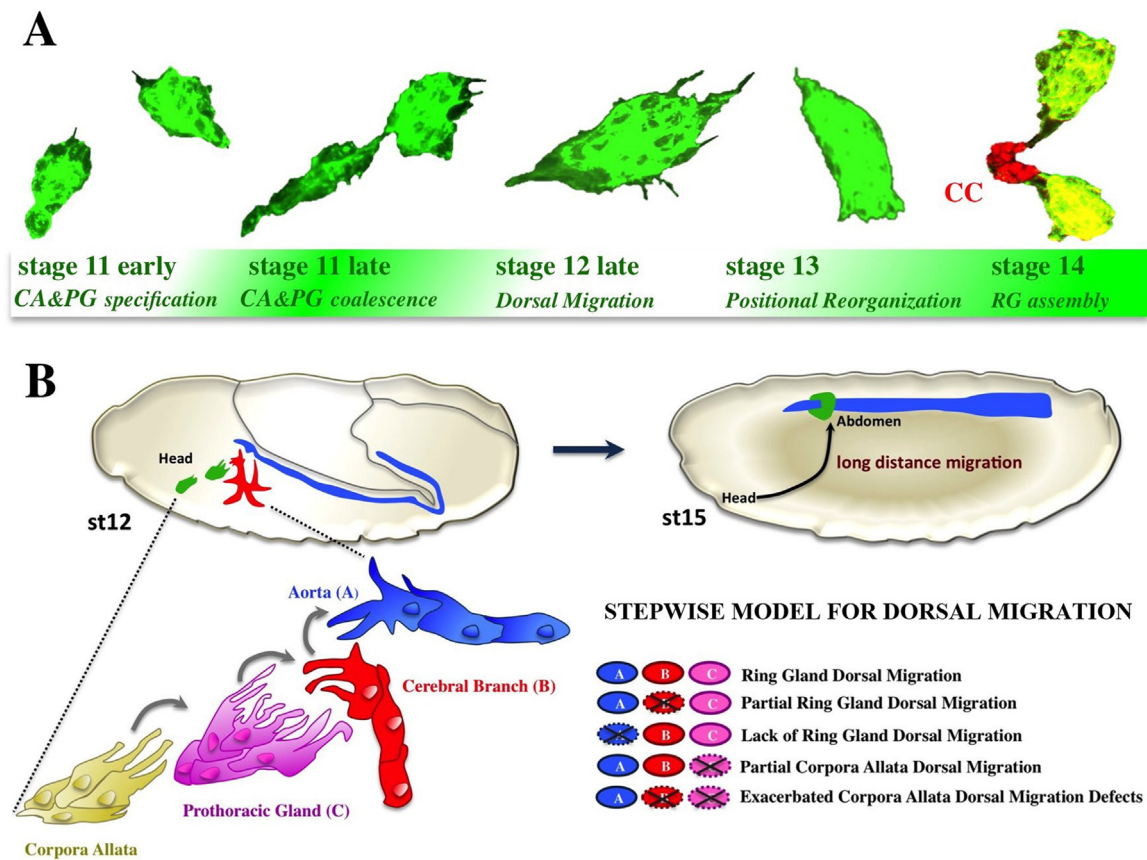


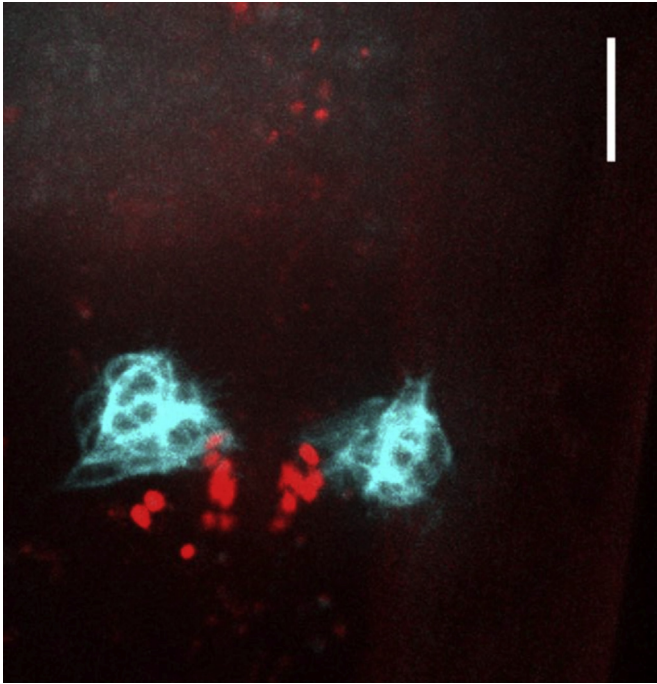
Fig. 4. Summary of ring gland formation and step-by-step migration model. (A) Various stages of CA and PG migration in wild type embryos. The primordia extend filopodia towards the surrounding tissues. Filopodia accumulate in directions contacting organs before the primordium migrate towards them. The CA and PG coalesce at st12 and at st13 the CA/PG reorients after contacting the aorta. The CA/PG from each side of the embryo fuse to the CC primordium (red) making a transitory V shape structure. (A) are confocal images transformed with Imaris. (B) Stepwise model for gland migration. The gland primordia filopodia find close range targets with similar adhesion affinities. Movement towards a close range target allows the primordia finding a more distal target helping it to achieve the complete migration towards the aorta. Interaction of the corpora allata with the prothoracic gland [C] helps the CA reach the trachea. The PG/CA contact with the cerebral branch [B] helps them reach the anterior aorta [A] that is the final target. These three targets are reached by a one-segment short-range migratory process. Later dorsal migration following the aorta's dorsal closure represents a continuous short-range migratory movement.

dorsal midline of the first abdominal segment (summarised in Fig. 4A). Focusing mostly on the CA and the PG, we find that at early st11 after the CA and PG are specified by *Dfd* and *Scr*, the primordia experience an EMT and extend filopodia towards their surrounding environment. At late st11 the CA and PG contact and at st12 coalesce into a single primordium that migrates posterior and dorsally towards the tracheal cerebral branch. At st13 the CA/PG attach to the aorta and reorganise their position as they fuse to the corpora cardiaca that have reached the ventral part of the anterior aorta. This generates at st14 a transient V shaped structure where both corpora cardiaca occupy the central position and are attached on each side to the prothoracic glands that connect distally to the corpora allata (Fig. 4A). The V shaped structure resolves into a ring around the anterior aorta as the CA continue their dorsal migration and fuse to each other.

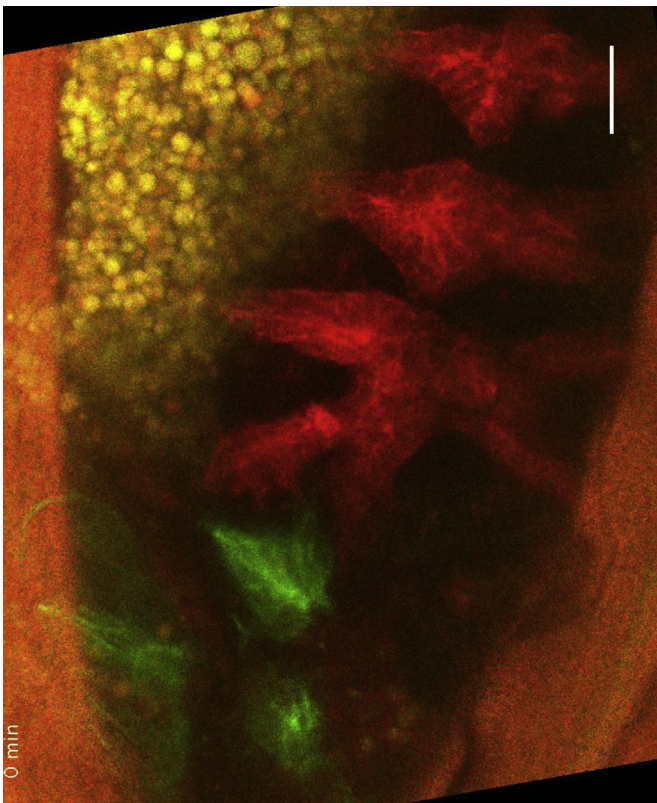
4.1. A sequence of short-range migratory movements directs the long-range gland migration

Our results demonstrate that the three gland primordia can reach the anterior aorta independently of each other and that the dorsal vessel is the main cue organizing the ring gland. We find that this long-range migration is composed of a sequence of short-range migratory steps that are amplified by the major

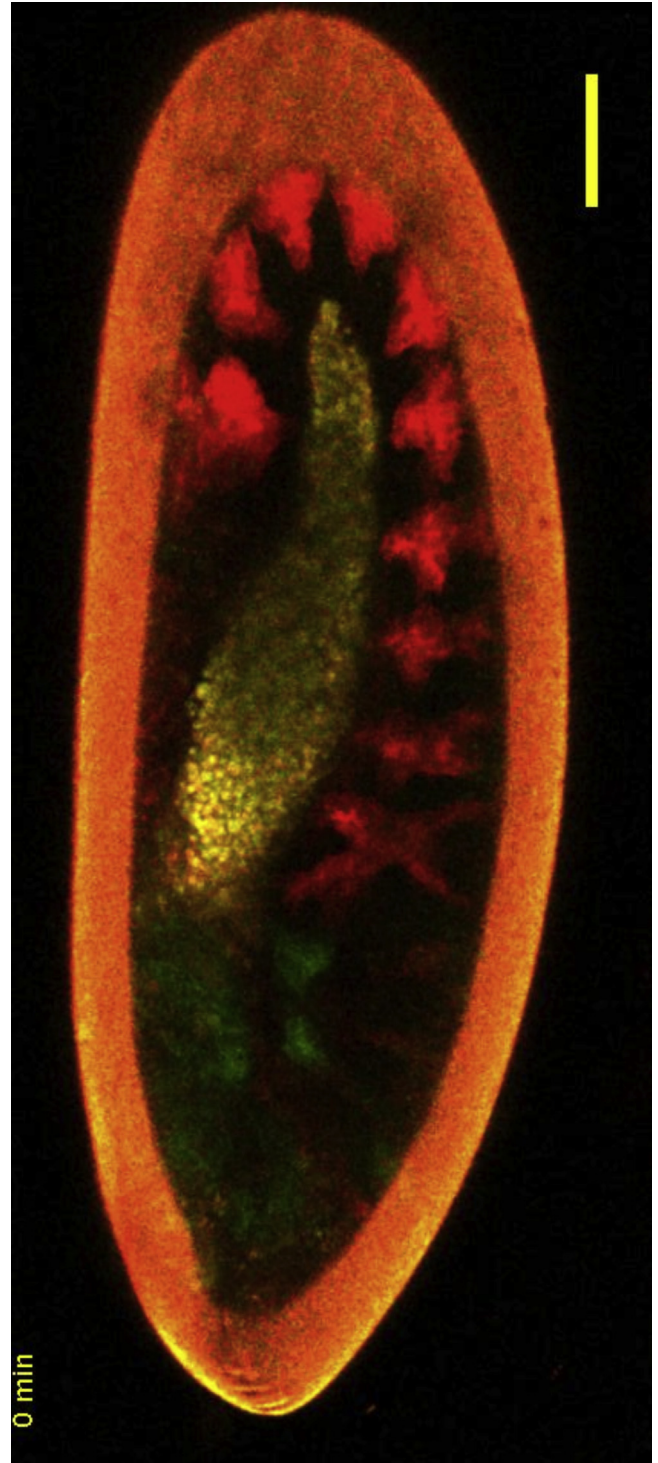
morphogenetic movements happening during embryogenesis. After the initial EMT of the CA and the PG, these primordia extend filopodia in various directions towards the surrounding tissues. Filopodia begin to accumulate in particular directions predicting the subsequent migratory direction, either because they sense a ligand source or due to filopodia stabilization after target-tissue contact. Several observations indicate that differential cell adhesion plays a fundamental role in gland migration. First, the CA coalescence with the PG and their consequent migration in tandem suggest that these two organs share cell affinities that could result in cell-contact filopodia stabilization. Second, we observe that the PG extends filopodia towards a precise location of the tracheal cerebral branch that reciprocates by extending filopodia towards the PG. Third, reciprocal filopodia interactions are also established between the aorta and the glands that evolve into a large area of contact between the gland and the aorta. This tight interaction remains through the rest of development as the gland follows the aorta movements during dorsal closure. Fourth, when the aorta dorsal closure is nearly complete, the contralateral CA primordia contact through their active filopodia (Video 5) before they fuse in a process probably involving filopodia stabilization through cell affinity. Finally, once they meet, the tissue complex formed by the ring gland, the cerebral branch and the anterior aorta is sufficiently robust to be displaced towards A1 as a single



Video 1. Ring gland primordia assembly and dorsal fusion. Dorsal view of an embryo from st13 to st15 with the corpora cardiaca labelled with *glass-RFP* (red) and the corpora allata and prothoracic glands labelled with *sna-rg-mGFP* (blue). A video clip is available online. Supplementary material related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.04.002>.



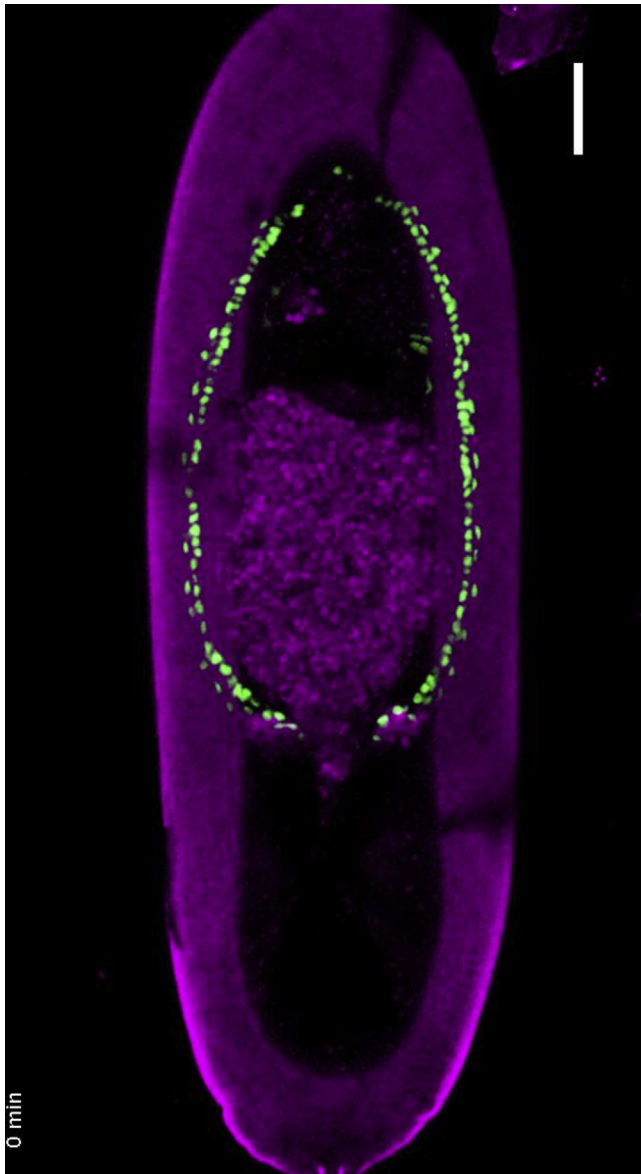
Video 2. Ring gland primordia coalescence and association to the cerebral branch. Lateral view of an embryo from st12 to st13. The tracheae are labelled with *btl-moe-mRFP* (red) and the corpora allata and prothoracic glands with *sna-rg-mGFP* (green). Close-up from the maxillary to the A1 segment. Supplementary material related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.04.002>.



Video 3. Ring gland primordia coalescence and dorsal migration in association with the cerebral branch. Lateral view of an embryo from st12 to st14. Trachea labelled with *btl-moe-mRFP* (red) and corpora allata and prothoracic glands with *sna-rg-mGFP* (green). Supplementary material related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.04.002>.

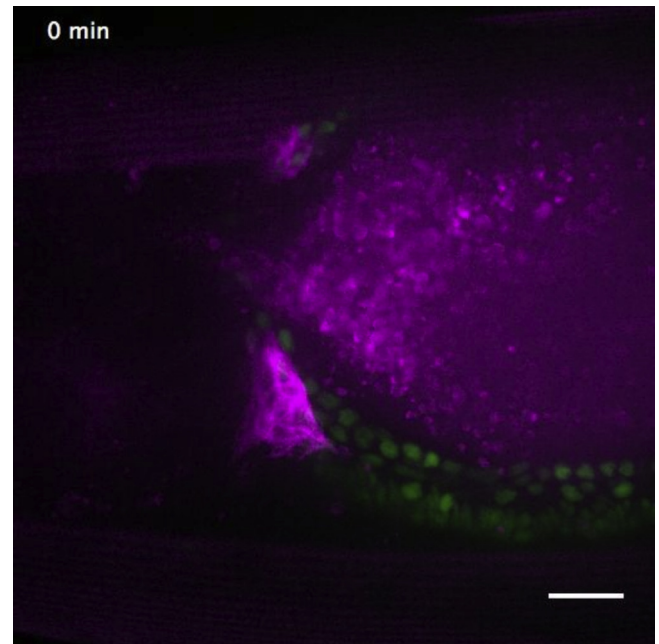
unit by the head involution movements. This indicates that the interaction between these organs is capable to resist the forces generated during head involution that displace the internal organs posteriorly with respect to the external ectoderm associated structures (Video 7).

The simultaneity of three major morphogenetic movements during gland migration and the requirement of several organs

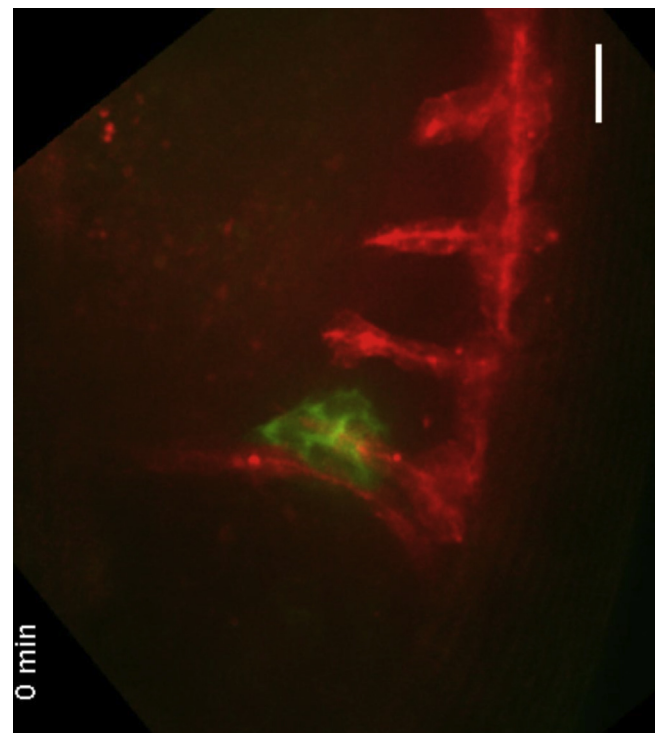


Video 4. Dorsal migration of the ring gland primordia in association with the anterior aorta. Dorsal view of an embryo during dorsal closure from st13 to st15. Dorsal vessel and lymph glands labelled with *hand-GFP* (green) and corpora allata and prothoracic glands with *sna-rg-mCherry* (purple). The visceral mesoderm is also labelled in green. Supplementary material related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.04.002>.

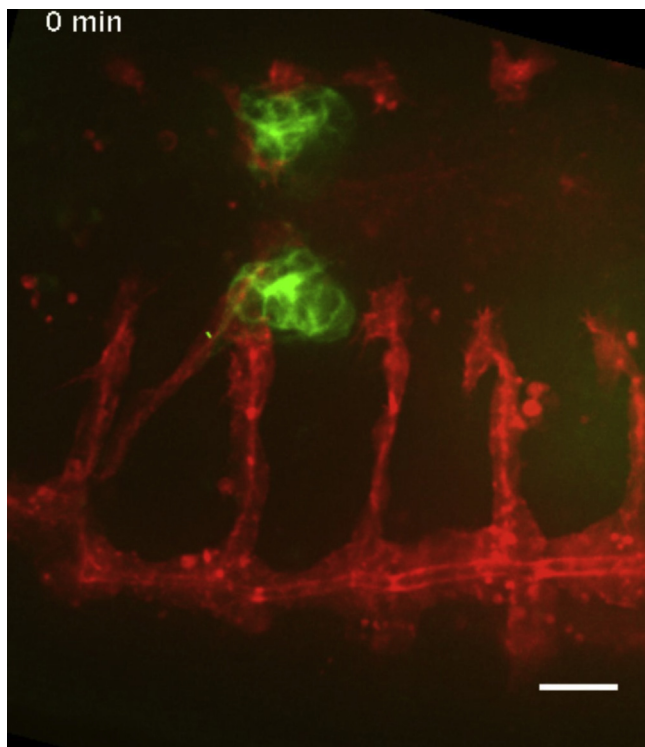
for the correct organisation of the ring gland complicates identifying transcription factors and signalling pathways directly involved in gland migration from others indirectly affecting gland movement. Although future work should address the molecules controlling gland migration, our data suggest that most movements could be caused by short-range filopodia extension followed by adhesion to target cells through extracellular matrix or membrane cell-adhesion molecules. Thus, despite the ring gland primordia migration involving collective migration similar to that of the *Drosophila* border cells, the navigation strategy used during migration is more akin to that followed during axon growth-cone navigation (Caudy and Bentley, 1986) or by the germ cells (Santos and Lehmann, 2004), making the endocrine glands of *Drosophila* an interesting new model of EMT and collective cell migration.



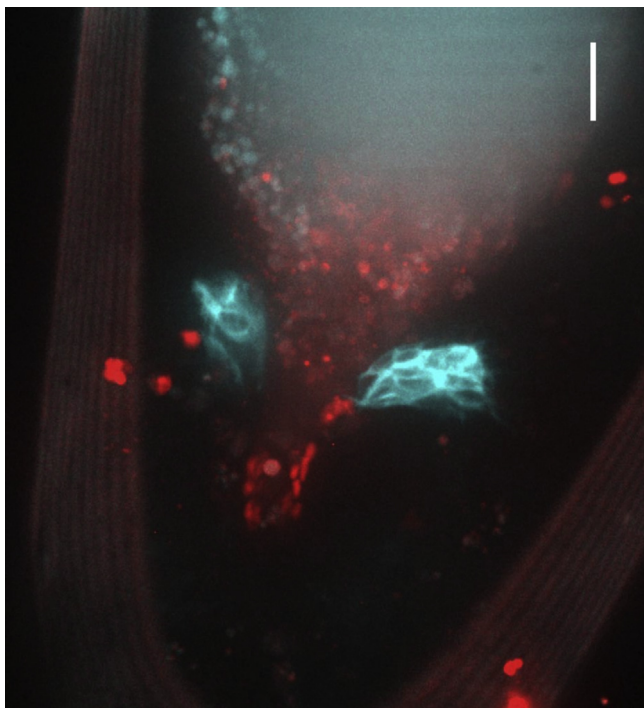
Video 5. Ring gland primordia association to the anterior aorta. Dorsal view of an embryo during dorsal closure from st13 to st15. The ring gland (purple) follows the dorsal vessel (green) during dorsal closure. Note the contralateral corpora allata extend filopodia over the aorta and contact. The head involution movements at about the 150 min results in the separation of the wing heart cells from the dorsal vessel. *hand-GFP* (green), *sna-rg-mCherry* (purple). Supplementary material related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.04.002>.



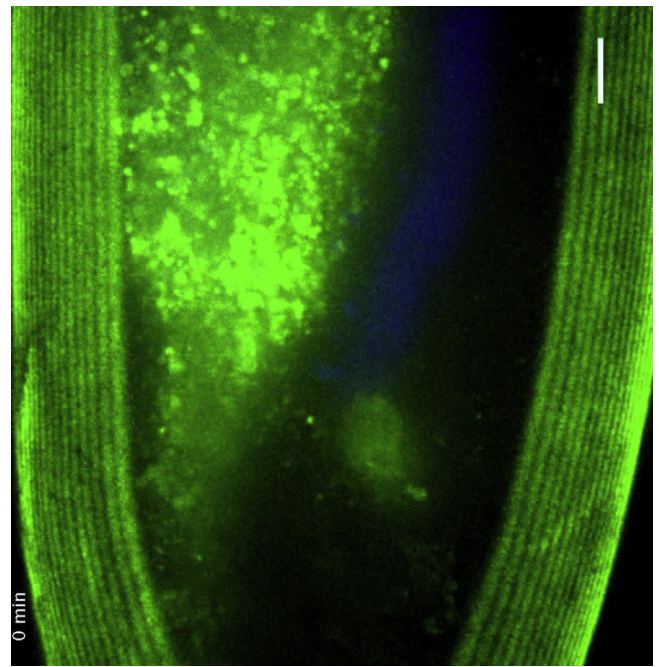
Video 6. Dorsal and posterior migration of the CA/PG primordia in association with the cerebral branch. Lateral view of an embryo from st13 to st15 with the trachea labelled with *btl-moe-mRFP* (red) and the corpora allata and prothoracic glands labelled with *sna-rg-mGFP* (green). Head involution causes the anterior displacement of the T2 and T3 dorsal tracheal branches with respect to the cerebral branch and glands. Supplementary material related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.04.002>.



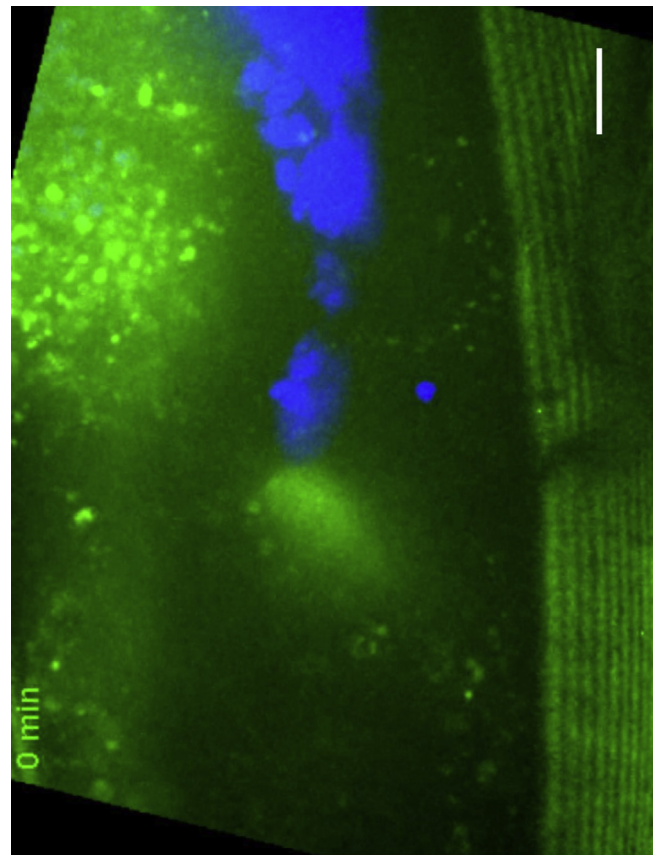
Video 7. Posterior movement to A1 and dorsal fusion of the CA/PG primordia in association with the cerebral branch. Dorso-lateral view of an embryo from st14 to st15 with the trachea labelled with *btl-moe-mRFP* (red) and the corpora allata and prothoracic glands labelled with *sna-rg-mGFP* (green). Head involution results in the relative movement of the internal and external organs displacing the cerebral branch from the first dorsal branch despite both originating in T2. Supplementary material related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.04.002>.



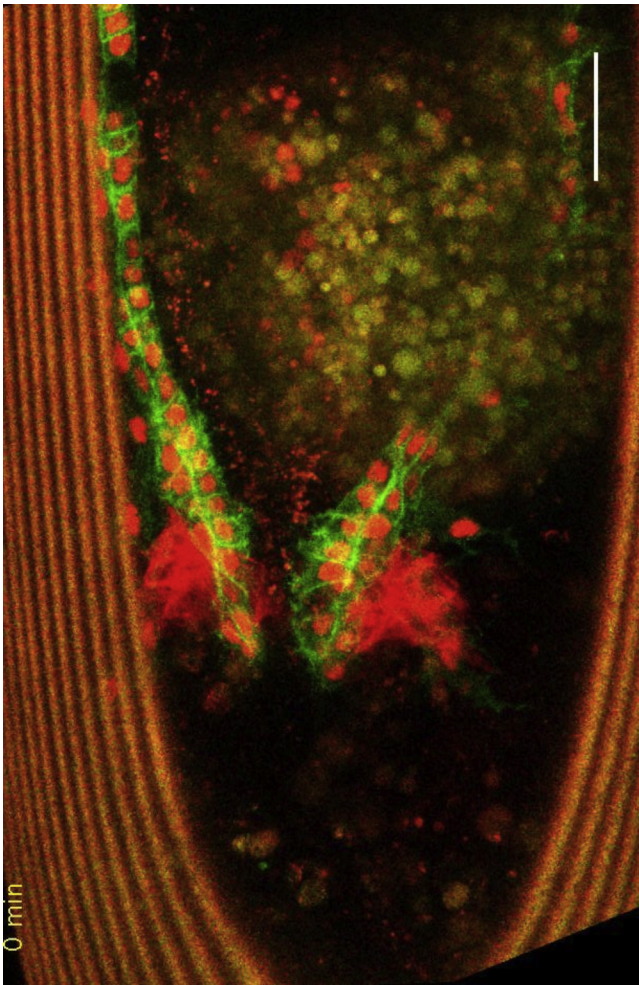
Video 8. Dorsal migration of the CA/PG primordia in the absence of CC. Dorsal view of an embryo from st13 to st16 with the *corpora cardiaca* labelled with *glass-RFP* (red) and the *corpora allata* and prothoracic glands labelled with *sna-rg-mGFP* (blue). Ablation of the *corpora cardiaca* is induced prior to its contact with the prothoracic gland. Note that some circulating haemocytes are also labelled with *glass-RFP*. Supplementary material related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.04.002>.



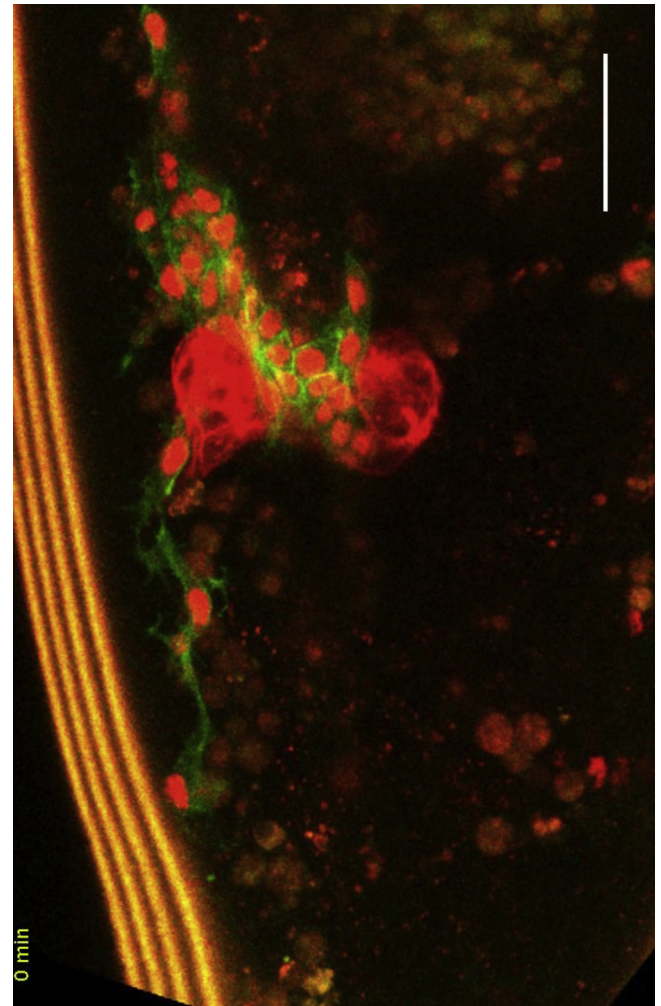
Video 9. Dorsal migration of the CA/PG primordia towards the dorsal aorta. Lateral view of a wild type embryo during dorsal closure from st13 to st14. The ring gland (green) follows the dorsal vessel (blue) during dorsal closure. The visceral mesoderm is also labelled in blue, *hand-GFP* (blue), *sna-rg-mGFP* (green). Supplementary material related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.04.002>.



Video 10. Migration of the CA/PG primordia in the absence of a dorsal vessel. Lateral view of a *twist-Gal4 UAS-cad5/6* embryo (lacking a dorsal vessel) during dorsal closure from st13 to st14. Blue staining labels the visceral mesoderm. In the absence of aorta the gland does not move dorsally. *hand-GFP* (blue), *sna-rg-mGFP* (green). Supplementary material related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.04.002>.



Video 11. Ring gland association to the anterior aorta during dorsal closure and head involution. Embryo at st14–15 labelled with *sna-rg-mCherry* and expressing *UAS-H2B-mCherry-P2A-eGFP-PH* with *hand-Gal4* in the dorsal vessel. The ring gland (red) follows the dorsal vessel (green membranes and red nuclei) during dorsal closure. Wing heart cells separate during head involution. Supplementary material related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.04.002>.

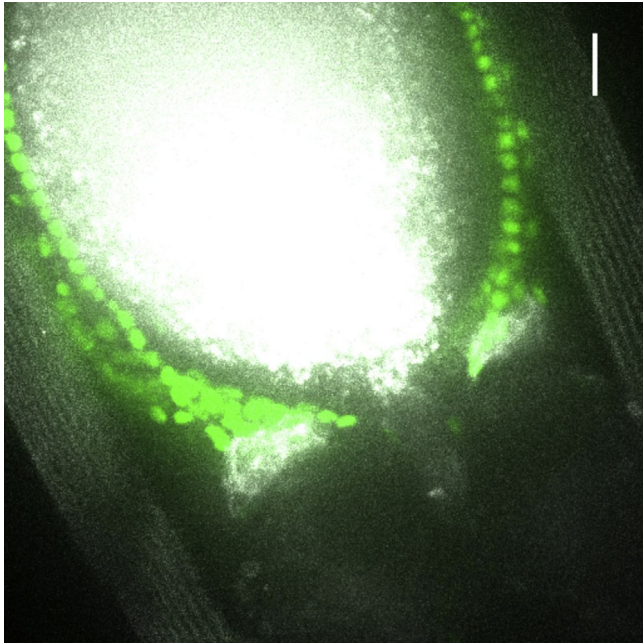


Video 12. Separation of wing heart precursors from the aorta during head involution. Embryo at st14–15 labelled with *sna-rg-mCherry* and expressing *UAS-H2B-mCherry-P2A-eGFP-PH* with *hand-Gal4* in the dorsal vessel. The ring gland (red) follows the dorsal vessel (green membranes and red nuclei). Although the ring gland transiently interacts with the wing heart cells as they separate during head involution, it stays attached to the anterior aorta. Supplementary material related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.04.002>.

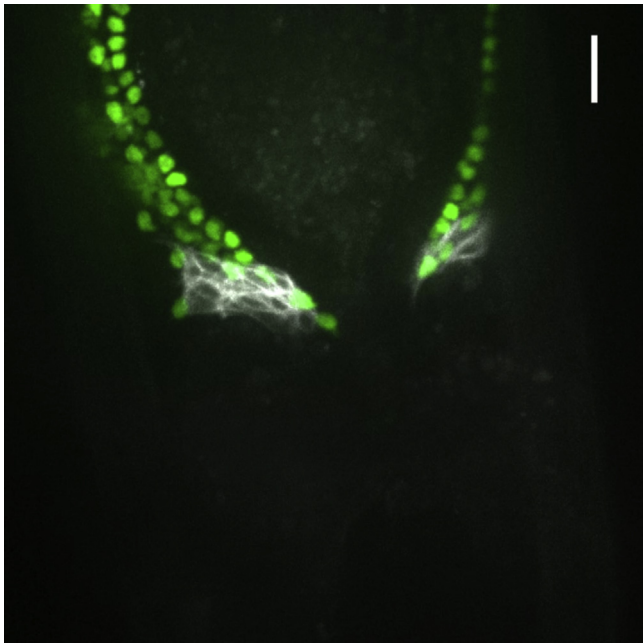
4.2. The origin of long-range gland migration during embryogenesis

Long-range migration is commonly observed during embryogenesis in most animals but the reason why this happens is not always evident. The explanation for why organs become specified at a distance from where they function is likely to be found in most cases at the evolutionary level. Organ specification requires the precise interaction of several transcription factors and signalling molecules occurring at very specific places. Such interactions are difficult to be reproduced by chance in another position and thus if an organ function is more efficient in a different location, evolutionary pressure may solve the problem by a short migration of the organ primordium rather than by the redeployment of the whole gene network in novel locations. The disposition of the fly endocrine glands as a ring around the opening of the anterior aorta is probably ideal for haemolymph hormone spreading. However, this requires the repositioning of the three gland primordia from the head segments where they are specified to the dorsal part of the A1 segment where the aorta is located in the larva. Our study shows that this long-range migration is composed of short migratory steps that help the relocation of the gland primordia as the embryo is

experiencing major morphological transformations. Interestingly, when we consider where the homologous glands to the CC, the CA and the PG are located in arthropods we can see that the organisation of the ring gland also has been achieved in a step-by-step process. The Crustacean equivalent of these glands: pericardial organ, mandibular organ and Y-organ are located independently at separate locations (Chang and O'Connor, 1977; Hartenstein, 2006; Laufer et al., 1987). This changed in most insects where the CC and the CA are associated but the PG is located in a different position. It is only in the Diptera, and specifically in flies (Cyclorrhapha), that all three glands form a single complex (Nijhout, 1994). Thus, as the association of the glands in arthropods has been achieved step by step during evolution, it is logical that the apparent long-range migration of the *Drosophila* primordia to form the ring gland is controlled as a sequence of independent short step migratory movements. These observations and our previous work showing that glands and trachea may have originated from the divergent evolution of an ancient repeated metameric structure (Sánchez-Higueras et al., 2014), make the insect endocrine organs a unique model to understand the evolution of cell migration processes.



Video 13. Behaviour of the ring gland primordia after aorta ablation. Dorsal view. After aorta ablation the ring gland moves erratically following first a wing heart cell and later turning back. Dorsal vessel and lymph glands labelled with *hand-GFP* (green) and corpora allata and prothoracic glands with *sna-rg-mCherry* (white). Supplementary material related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.04.002>.



Video 14. Behaviour of the ring gland primordia after aorta ablation. Dorsal view. After aorta ablation the ring gland moves laterally following a wing heart cell. Dorsal vessel and lymph glands labelled with *hand-GFP* (green) and corpora allata and prothoracic glands with *sna-rg-mCherry* (white). Supplementary material related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.04.002>.

Acknowledgments

We thank M. Averof for discussions, J. Culi for critical reading of the manuscript and S. Araujo, M. Baylies, J. Casanova, R. Crips, B. Estrada, F. Hirth, S.K. Kim, M. Leptin, M. Ruiz for antibodies and reagents. C.S.-H. holds an FPI fellowship from MICINN. This work

was supported by Grants of the Junta de Andalucía, and the Spanish MICINN/MINECO/FEDER to J.C.-G.H.

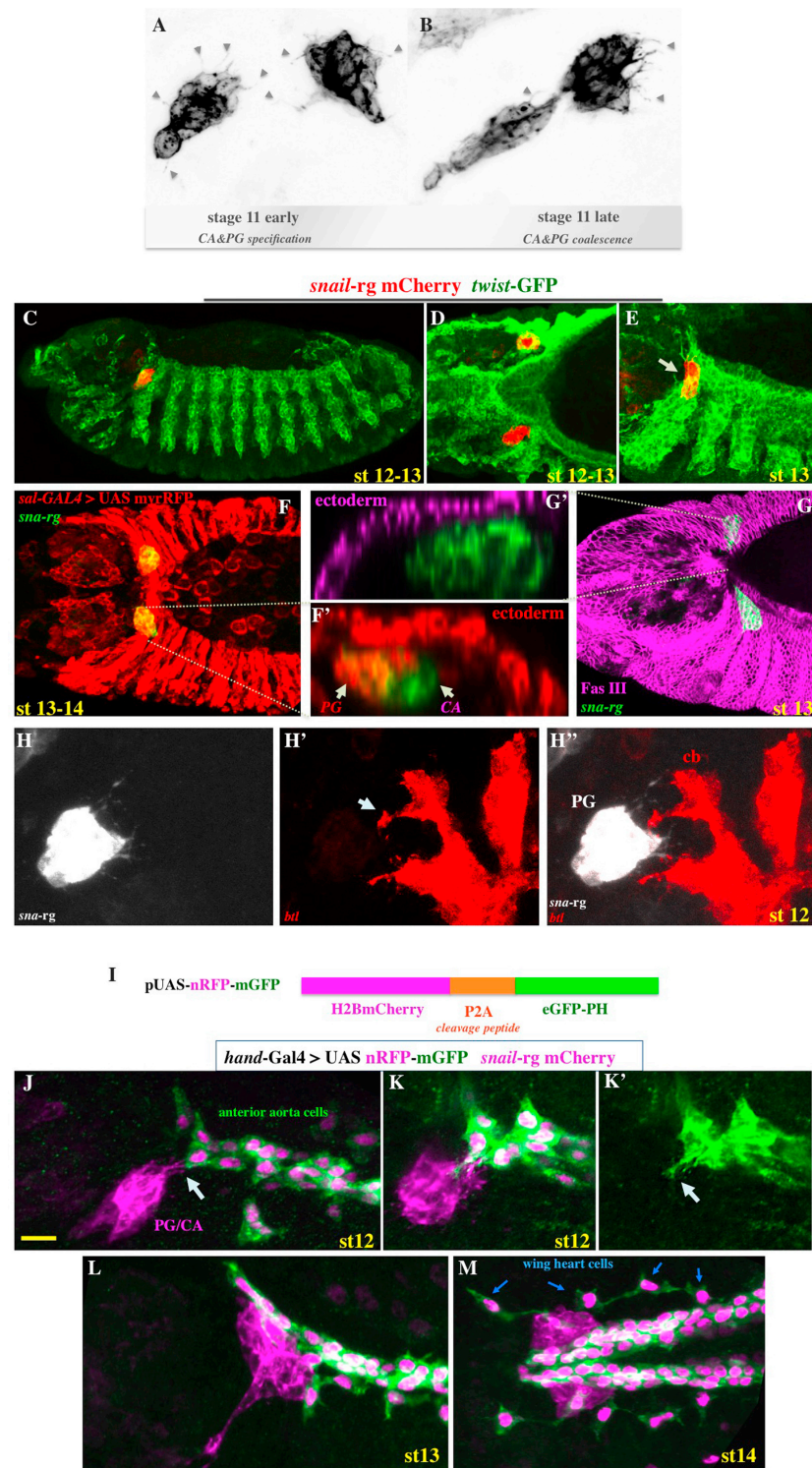
Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.04.002>.

References

- Aman, A., Piotrowski, T., 2010. Cell migration during morphogenesis. *Dev. Biol.* 341, 20–33.
- Beiman, M., Shilo, B.Z., Volk, T., 1996. Heartless, a Drosophila FGF receptor homolog, is essential for cell migration and establishment of several mesodermal lineages. *Genes Dev.* 10, 2993–3002.
- Bodmer, R., 1993. The gene tinman is required for specification of the heart and visceral muscles in Drosophila. *Development* 118, 719–729.
- Bodmer, R., Jan, L.Y., Jan, Y.N., 1990. A new homeobox-containing gene, msh-2, is transiently expressed early during mesoderm formation of Drosophila. *Development* 110, 661–669.
- Caudy, M., Bentley, D., 1986. Pioneer growth cone steering along a series of neuronal and non-neuronal cues of different affinities. *J. Neurosci.* 6, 1781–1795.
- Caussinus, E., Colombelli, J., Affolter, M., 2008. Tip-cell migration controls stalk-cell intercalation during Drosophila tracheal tube elongation. *Curr. Biol.* 18, 1727–1734.
- Chang, E.S., O'Connor, J.D., 1977. Secretion of alpha-ecdysone by crab Y-organs in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 615–618.
- Chiang, C., Young, K.E., Beachy, P.A., 1995. Control of Drosophila tracheal branching by the novel homeodomain gene unplugged, a regulatory target for genes of the bithorax complex. *Development* 121, 3901–3912.
- Clevers, H., 2006. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127, 469–480.
- Frasch, M., 1995. Induction of visceral and cardiac mesoderm by ectodermal Dpp in the early Drosophila embryo. *Nature* 374, 464–467.
- Friedl, P., Gilmour, D., 2009. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 445–457.
- Gisselbrecht, S., Skeath, J.B., Doe, C.Q., Michelson, A.M., 1996. heartless encodes a fibroblast growth factor receptor (DFR1/DFGF-R2) involved in the directional migration of early mesodermal cells in the Drosophila embryo. *Genes Dev.* 10, 3003–3017.
- Hamada, F., Tomoyasu, Y., Takatsu, Y., Nakamura, M., Nagai, S., Suzuki, A., Fujita, F., Shibuya, H., Toyoshima, K., Ueno, N., Akiyama, T., 1999. Negative regulation of Wingless signaling by d-axin, a Drosophila homolog of axin. *Science* 283, 1739–1742.
- Han, Z., Olson, E.N., 2005. Hand is a direct target of Tinman and GATA factors during Drosophila cardiogenesis and hematopoiesis. *Development* 132, 3525–3536.
- Han, Z., Yi, P., Li, X., Olson, E.N., 2006. Hand, an evolutionarily conserved bHLH transcription factor required for Drosophila cardiogenesis and hematopoiesis. *Development* 133, 1175–1182.
- Hartenstein, V., 2006. The neuroendocrine system of invertebrates: a developmental and evolutionary perspective. *J. Endocrinol.* 190, 555–570.
- Isaac, D.D., Andrew, D.J., 1996. Tubulogenesis in Drosophila: a requirement for the trachealless gene product. *Genes Dev.* 10, 103–117.
- Kim, J.H., Lee, S.R., Li, L.H., Park, H.J., Park, J.H., Lee, K.Y., Kim, M.K., Shin, B.A., Choi, S. Y., 2011. High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice. *PLoS One* 6, e18556.
- Laufer, H., Borst, D., Baker, F.C., Reuter, C.C., Tsai, L.W., Schooley, D.A., Carrasco, C., Sinkus, M., 1987. Identification of a juvenile hormone-like compound in a crustacean. *Science* 235, 202–205.
- Nijhout, H.F., 1994. *Insect Hormones*. Princeton University Press, Princeton.
- Park, M., Wu, X., Golden, K., Axelrod, J.D., Bodmer, R., 1996. The wingless signaling pathway is directly involved in Drosophila heart development. *Dev. Biol.* 177, 104–116.
- Park, S., Bustamante, E.L., Antonova, J., McLean, G.W., Kim, S.K., 2011. Specification of Drosophila corpora cardiaca neuroendocrine cells from mesoderm is regulated by Notch signaling. *PLoS Genet.* 7, e1002241.
- Perrin, L., Monier, B., Ponzietti, R., Astier, M., Semeriva, M., 2004. Drosophila cardiac tube organogenesis requires multiple phases of Hox activity. *Dev. Biol.* 272, 419–431.
- Revenu, C., Gilmour, D., 2009. EMT 2.0: shaping epithelia through collective migration. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 19, 338–342.
- Rorth, P., 2009. Collective cell migration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 25, 407–429.
- Sánchez-Higueras, C., Sotillos, S., Castelli-Gair Hombria, J., 2014. Common origin of insect trachea and endocrine organs from a segmentally repeated precursor. *Curr. Biol.* 24, 76–81.
- Santos, A.C., Lehmann, R., 2004. Germ cell specification and migration in Drosophila and beyond. *Curr. Biol.* 14, R578–R589.
- Schafer, G., Narasimha, M., Vogelsang, E., Leptin, M., 2014. Cadherin switching during the formation and differentiation of the Drosophila mesoderm – implications for epithelial-to-mesenchymal transitions. *J. Cell Sci.* 127, 1511–1522.

- Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y., Nieto, M.A., 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871–890.
- Togel, M., Pass, G., Paululat, A., 2008. The *Drosophila* wing hearts originate from pericardial cells and are essential for wing maturation. *Dev. Biol.* 318, 29–37.
- Warren, J.T., Petryk, A., Marques, G., Parvy, J.P., Shinoda, T., Itoyama, K., Kobayashi, J., Jarcho, M., Li, Y., O'Connor, M.B., Dauphin-Villemant, C., Gilbert, L.I., 2004. Phantom encodes the 25-hydroxylase of *Drosophila melanogaster* and *Bombyx mori*: a P450 enzyme critical in ecdysone biosynthesis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 991–1010.
- Wilk, R., Weizman, I., Shilo, B.Z., 1996. trachealess encodes a bHLH-PAS protein that is an inducer of tracheal cell fates in *Drosophila*. *Genes Dev.* 10, 93–102.
- Wu, X., Golden, K., Bodmer, R., 1995. Heart development in *Drosophila* requires the segment polarity gene wingless. *Dev. Biol.* 169, 619–628.



1. Interaction of the ring gland primordia with the surrounding environment. (A) CA and PG extending filopodia in various directions (arrowheads) soon after experiencing the EMT. (B) Filopodia concentrate between the CA and the PG and in the dorsal posterior region (arrowheads). (C-E) The CA/PG migrate through the mesoderm (labelled in green with *twi-actinGFP*) and (F-G) under the ectoderm. In (F) *sal-Gal4* drives UAS-myrRFP expression in the dorsal ectoderm and in the prothoracic gland primordium. In (G) FasIII labels the ectoderm. (H-H'') The glands send filopodia towards the cerebral branch that sends filopodia back to the gland (arrow in H'). (I) Schematic representation of the *UAS-H2B-mCherry-P2A-eGFP-PH* construct. This construct expresses simultaneously Histone H2 fused to mCherry and the eGFP-PH membrane localised protein under the regulation of the UAS Gal4 inducible promoter. The P2A peptide results in the separation of the two proteins during translation that can independently label the membrane and the nucleus. (J-M) Double stained embryos expressing *UAS-H2B-mCherry-P2A-eGFP-PH* in the dorsal vessel primordia and membrane-Cherry in the glands (purple). Note the glands extend filopodia towards the anterior aorta (J) and the aorta extends filopodia towards the gland (K-K'). After st13 the gland attaches to the anterior aorta (L-M).

Chapter 12

Control of Organogenesis by Hox Genes

J. Castelli-Gair Hombria, C. Sánchez-Higueras
and E. Sánchez-Herrero

Abstract Hox genes encode a class of animal transcription factors well known for the segment transformations they generate when mutated or expressed ectopically. Hox genes are stably expressed during development in partially overlapping antero-posterior domains of the body where they impose their morphological characteristics. This is achieved in two main ways: first, Hox proteins are capable of activating (or repressing) the expression of gene networks responsible for cell specification and organ formation, and second, they compete out the activity of other Hox proteins, either by transcriptional repression or by posterior prevalence. Studies in *Drosophila* indicate that Hox proteins regulate genes required for organ development, indicating that Hox genes play a role in organogenesis that goes beyond providing antero-posterior regionalization. In a few cases Hox expression is transient, and the input is just required for organ specification. However, in other cases the Hox proteins remain active after organ specification and their function is required for fundamental aspects of organogenesis and cell differentiation.

Keywords Organogenesis · Hox · Gene networks · *Drosophila* · Development

12.1 Introduction

Hox genes encode homeodomain transcription factors that confer specific morphological characteristics to the regions of the body where they are expressed. Mutations in Hox genes can cause spectacular homeotic transformations, where one segment transforms its morphology into that of a neighboring segment. The first

J. Castelli-Gair Hombria (✉) · C. Sánchez-Higueras
Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CSIC/JA/Universidad Pablo de Olavide),
Seville, Spain
e-mail: jcashom@upo.es

E. Sánchez-Herrero
Centro de Biología Molecular-Severo Ochoa (CSIC/Universidad Autónoma de Madrid),
Madrid, Spain

Hox mutation described, *bx*¹, was isolated in *Drosophila* by Calvin Bridges around 1915 and was later studied in depth by Edward B. Lewis, who found it mapped to a region of the chromosome where other homeotic mutations clustered. Lewis published a comprehensive genetic analysis of this region, named the Bithorax complex (BX-C), and suggested it contained several genes controlling the morphological divergence of each thoracic and abdominal segment (Lewis 1978). Later work revealed that the BX-C is composed of only three genes: *Ultrabithorax* (*Ubx*), *abdominal-A* (*abd-A*) and *Abdominal-B* (*Abd-B*) (Sánchez-Herrero et al. 1985; Tiong et al. 1985) and that many of the mutations originally isolated were affecting cis-regulatory elements regulating the temporal and spatial expression of these three genes. A second homeotic complex was found, the Antennapedia complex (ANT-C) that included five Hox genes specifying the morphology of cephalic and anterior thoracic segments: *labial* (*lab*), *proboscipedia* (*pb*), *Deformed* (*Dfd*), *Sex combs reduced* (*Scr*) and *Antennapedia* (*Antp*) (Kaufman et al. 1980, 1990) (Fig. 12.1). Lewis proposed that the BX-C originated by gene duplication in an ancestral segmented millipede-like arthropod with a body composed of identical repeated units. After duplication, the BX-C genes would have evolved by mutation, acquiring novel functions that resulted in the stepwise diversification of the segment shape along the anterior-posterior body axis (Lewis 1978). However, molecular analyses demonstrated that Hox genes are also present in vertebrates and they must have appeared much earlier in evolution (McGinnis et al. 1984a, b, c; Scott and Weiner 1984).

Hox genes were originally seen as factors implementing genetic switches between homologous segments, conferring to each of them a defined genetic

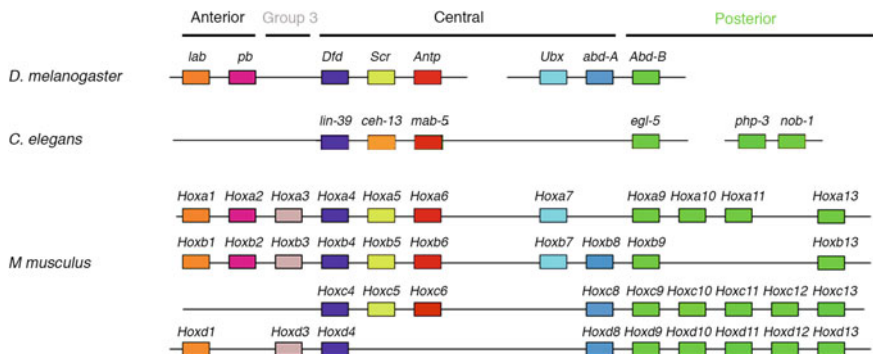


Fig. 12.1 Hox cluster organization in fruit fly, worm and mouse. Hox genes localized in the same cluster are represented as a box on a continuous line, the color of the box represents gene homology. The relative position of most Hox genes in the cluster is maintained during evolution and as a result orthologous genes tend to appear in columns. In *Drosophila* the single cluster has split in two. In the Nematode *Caenorhabditis elegans*, many Hox genes have been lost but the Abd-B like homolog has experienced an expansion (green boxes). In mice, as in humans, two cluster duplications have given rise to four Hox clusters (*Hox a-Hox d*). The *Drosophila* group 3 genes have evolved losing their Hox function and they are not represented in this figure. Modified from Foronda et al. (2009)

address, constant in time and uniform in space. Later research revealed the complex temporal and spatial control of these genes, their role in elaborating genetic circuits and their specific tissue and organ requirements. In this chapter, focusing mostly in *Drosophila*, we review the function of Hox genes in organogenesis.

12.2 The Origin of Hox Genes

Hox genes can be found in all animals except sponges (Porifera) and comb jellies (Ctenophora) (Holland 2013). Hox clusters evolved from a smaller primordial cluster probably containing only four genes, similar to the situation now present in simple animals like Cnidarians and Acoeles. The number of Hox genes in this hypothetical cluster expanded by tandem duplication explaining why all existing Hox genes can be classified in one of four categories (Fig. 12.1), known as: Anterior, Group 3, Central or Posterior Hox genes (Garcia-Fernandez 2005a, b). These duplications gave rise to a cluster formed by seven Hox genes that is likely to represent the situation at the time when the Cambrian explosion of animal forms occurred. Afterwards, independent duplications expanded the number of Hox genes per cluster from 9 to 15 in different animal lineages, while in other lineages there was a Hox gene loss. Loss is especially evident in Nematode worms, which have lost up to five Hox orthologs (Aboobaker and Blaxter 2003). While originally Hox genes were organized as a single cluster, in some animals the cluster split, as is now observed in *Drosophila melanogaster*, where it has subdivided into the ANT-C and BX-C (Fig. 12.1).

An extreme case of evolution by duplication of whole Hox clusters occurred in the lineage leading to vertebrates. Cephalochordates have a single Hox cluster, which is thought to be the primitive Chordate situation, but in vertebrates two successive whole genome duplication events gave rise to four clusters, named HoxA, HoxB, HoxC and HoxD in mouse and human. In teleost fish, additional whole genome duplication probably led to the existence of eight Hox clusters. These duplications caused a certain level of redundancy that was followed by Hox gene losses, leading to a final number of seven clusters (Hueber et al. 2010). As a consequence of these genomic changes, the total number of Hox genes varies from the 15 Hox genes organized in a single cluster of the Cephalochordates, to the 39 genes in four clusters present in mouse and human and the 46 to 49 Hox genes in seven clusters found in various fish (Holland 2013; Garcia-Fernandez 2005a, b; Aboobaker and Blaxter 2003; Hueber et al. 2010).

Although the large evolutionary distances separating all animal phyla makes it difficult to establish direct correspondence among Hox genes, their common origin from an ancient cluster is reflected by the presence of orthologous genes. Orthologous genes derive from the same gene present in the cluster before the species diverged (or the whole genome duplications occurred) and thus are more similar to a gene in another species than to other Hox genes in the cluster where it is located. Thus, when comparing the human and *Drosophila* Hox sequences, *Hox1*

corresponds to *lab*, *Hox2* to *pb*, *Hox3* to *zerknüllt* and *bicoid* (two genes that have lost their Hox function in *Drosophila*), *Hox4* to *Dfd*, *Hox5* to *Scr*, *Hox6–Hox8* to *Antp*, *Ubx* and *abd-A*, and *Hox9–Hox13* (which duplicated in the vertebrate lineage) corresponding to *Abd-B* in *Drosophila* (Hueber et al. 2010). Moreover, these genes can be associated to each of the four genes present in the predicted primordial cluster. The ‘anterior’ group is represented by *Hox1/lab* and *Hox2/pb*; the ‘group 3’ by *Hox3/zen-bic*; the ‘middle’ group by *Hox4/Dfd*, *Hox5/Scr*, *Hox6–8/Antp-Ubx-abdA* and the ‘posterior’ group by *Hox9–15/Abd-B* (Holland 2013; Hueber et al. 2010; Vinagre et al. 2010).

In animals where gene manipulation is available it has been shown that, by and large, the Hox genes play the same role: to specify the organs and structures present in the tissues where they are expressed (Fig. 12.2). For example, ribs in mice are formed in the Hox6 expressing segments, while they are absent in the abdominal segments that do not express Hox6. Experimental manipulation activating Hox6 in the abdomen induces the formation of ribs associated to abdominal vertebrae (Vinagre et al. 2010). In a parallel situation in flies, the respiratory posterior spiracles only form in the embryonic eighth abdominal (A8) segment induced by expression of the Abd-B Hox protein. Forced Abd-B expression in all segments results in the formation of additional respiratory organs along the fly embryo trunk (Lovegrove et al. 2006).

12.3 Revealing Hox Function

Given the nature of Hox proteins as transcription factors, the first step to understand their function in development is to identify their direct targets. Knowledge of the in vitro DNA binding specificity has not been very useful in this aspect as the sequence bound by all Hox proteins is very similar (Noyes et al. 2008). Target-specific selection often requires the interaction of the Hox proteins with cofactor and collaborator proteins, some of which have been identified (Mann et al. 2009). The best-characterized cofactors are the *Drosophila*TALE class homeodomain proteins Exd and Hth, and their vertebrate Pbx-Meis/Prep homologs. Besides the homeodomain, these cofactors have additional conserved domains (Burglin 1997; Longobardi et al. 2014). TALE homeodomain proteins have an ancient origin as they can be found in plants (Holland 2013; Mukherjee and Burglin 2007). Hox and Pbx/Meis form protein complexes that increase DNA affinity and DNA binding specificity helping the Hox proteins to select their direct specific targets (Mann et al. 2009; Rezsöházy et al. 2015). Although most Hox targets are bound by the HOX/PBX/MEIS protein complex, there are cases where the Hox protein binds its targets in the absence of these cofactors (Galant et al. 2002). In most cases the interaction between the HOX and the PBX/MEIS co-factors is cooperative, but an antagonistic interaction has been observed with Abd-B that may also occur with some of the Abd-B like vertebrate Hox proteins (Rivas et al. 2013).

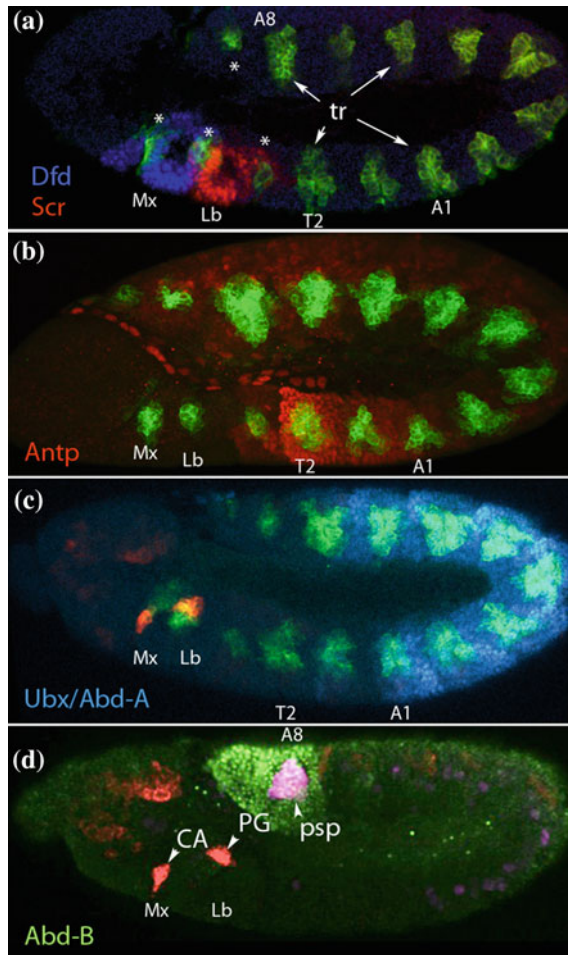


Fig. 12.2 Expression of Hox proteins with respect to different organ primordia. **a–d** Expression of six Hox proteins in *Drosophila* embryos at the extended germ band stage, when most organogenetic processes begin. At this stage, the embryo is folded on itself so the posterior abdominal segments appear dorsal to the anterior segments. **a** Expression of Dfd (blue) and Scr (red). **b** Expression of Antp (red). **c** Expression of Ubx and Abd-A (blue) using an antibody that detects both proteins. **d** Expression of Abd-B (green). Figures **a–c** also show the expression of a *vvl* enhancer (green) active in the tracheal pits in T2–A8, and homologous cells in cephalic and caudal segments [labeled in **a** as (tr) and (*) respectively]. In **c–d** the *sna-rg* enhancer (red) also labels the primordia of the corpora allata (CA) and the prothoracic glands (PG) in the maxillary and labial segments. In **d** the *ems* enhancer in the posterior spiracle (psp) primordium is labeled in pink. Mx maxilla; Lb labium; T2 second thoracic segment; A1 first abdominal segment; A8 eighth abdominal segment. Lateral views of st11 embryos, anterior to the left, dorsal up

Molecular, biochemical, genetic and genomic approaches have been applied to identify direct Hox targets (Hueber and Lohmann 2008; Choo and Russell 2011). Classical functional genetic approaches are very informative to understand how the Hox genetic information is converted into morphogenetic/organogenetic information, but is extremely time-consuming and does not distinguish between direct and indirect targets. Molecular and biochemical approaches provide a global, less biased, view of the regulatory process but the putative targets have to be validated by functional genetic analysis. Targets of Ubx have been isolated by either immunoprecipitation of protein-DNA complexes from native chromatin (Gould et al. 1990; Graba et al. 1992) or UV crosslinked chromatin (Graba et al. 1992) and by selecting Hox DNA binding sites in yeast (Mastick et al. 1995). Microarray profiling discovers full gene cascades activated downstream of particular Hox genes but cannot predict what interactions are direct (Hueber et al. 2007; Pavlopoulos and Akam 2011). The use of specific Hox antibodies for Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) provides candidates for direct regulation. ChIP followed by full genome sequencing is an efficient approach to isolate cis-regulatory modules (CRM) that are directly bound by Hox proteins (Donaldson et al. 2012; McCabe and Innis 2005) (reviewed in Choo and Russell 2011; Sánchez-Herrero 2013). Each approach has its own advantages, but the full understanding of the Hox regulatory function requires the combined use of these techniques.

12.3.1 *Hox Genes as Transcriptional Repressors*

Hox genes are expressed in restricted domains along the antero-posterior axis, where they are active. In *Drosophila*, the domains of Hox gene expression are, in general, parasegmental (PS). A parasegment is comprised by the posterior compartment of one segment and the anterior compartment of the following segment (Martinez-Arias and Lawrence 1985) (Fig. 12.3). In these domains, Hox genes have been found to act both as repressors or activators of transcription (Pearson et al. 2005). One of the first repression cases found was the negative cross-regulation observed among Hox genes in *Drosophila*. Posterior Hox proteins tend to repress the expression of anterior Hox genes. For example, in PS7-12 where *abd-A* is expressed, the Abd-A protein represses *Ubx* transcription. As a result, *Ubx* maximal levels of expression in the ectoderm occur in PS6, while in PS7-12 *Ubx* is expressed at lower levels. Mutation of *abd-A* results in the de-repression of *Ubx* in PS7-12 at the levels normally observed in PS6 (Struhl and White 1985). The down-regulation of *Ubx* by Abd-A is observed in the ectoderm, the nervous system and the visceral and somatic mesoderm. Although there are certain exceptions (Reuter and Scott 1990; Gummalla et al. 2012; Singh and Mishra 2014), similar interactions are observed among other Hox genes including *Antp*, *Ubx*, *abd-A* and *Abd-B*. Due to the large and complex cis regulatory modules present in the Hox genes, direct repression has been proven only in a few cases (Appel and Sakonju 1993). Anterior Hox gene down-regulation by posterior Hox proteins in *Drosophila* is not a

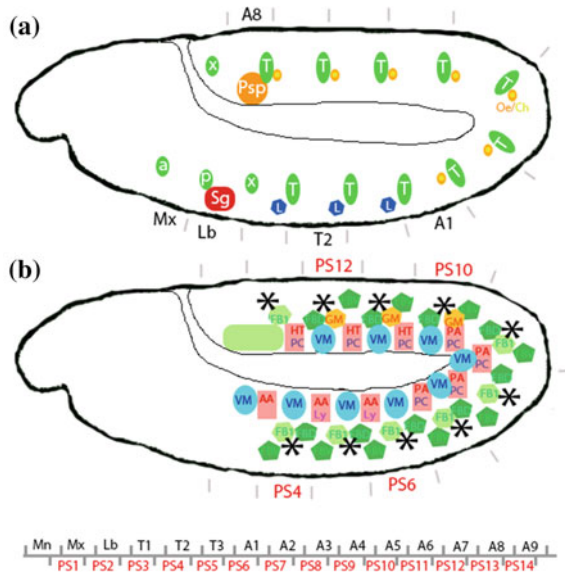


Fig. 12.3 Location of different organ primordia in the *Drosophila* embryo. Location of the primordia of ectodermal (a) or mesodermal organs (b) whose development is influenced by Hox expression. The scheme represents an embryo at the start of organogenesis (early st11). In a the extent of the different segments is demarcated by grey lines, while in b the grey lines demarcate parasegments (PS). The schema below shows the relationship of segments to parasegments. To facilitate the spatial comparison of both schemes, the tracheal pits are represented in b as large asterisks. Ectodermal organs: Sg salivary glands; L leg imaginal discs; T tracheal pits; a corpora allata; p prothorathic glands; psp posterior spiracles; Oe/Ch oenocytes/chordotonal primordia. x denotes primordia that do not give rise to any organs and integrate in the ectoderm. Mesodermal organs: pink rectangles represent primordia giving rise to: AA anterior aorta; PA posterior aorta; HT heart; Ly lymph glands; PC pericardial cells. Green pentagons represent fat body: FB1 primary fat body; FBD dorso lateral fat body; FBV ventral fat body; and orange pentagons, GM gonadal mesoderm homologous to primary fat body. VM trunk visceral mesoderm. Mesodermal precursor position differs in the posterior segments, with dorsal extended fat body precursors in PS13 localizing in the position occupied in other segments by the heart and visceral mesoderm primordia

universal rule. In most cases the down-regulation does not result in a complete repression, with some cells clearly co-expressing two Hox proteins. Moreover, the anterior *Drosophila* Hox genes *lab*, *Dfd* and *Scr* do not show negative regulation by posterior Hox proteins (Miller et al. 2001). For example, *Lab* and *Dfd* are co-expressed in many cells in the embryo (Diederich et al. 1991). Also, although *Scr* and *Dfd* pattern of expression is mostly non-overlapping, this is not due to negative cross-regulation, as in *Scr* mutants *Dfd* is not activated ectopically. In mice, anterior Hox genes are not transcriptionally repressed by posterior Hox proteins (Iimura et al. 2009), although when two Hox proteins co-express in a particular segment, the posterior one seems to be dominant over the anterior one, a

phenomenon described as posterior prevalence (Gonzalez-Reyes et al. 1990; Duboule and Morata 1994). Posterior prevalence and negative cross-regulation probably help the diversification of distinct segmental morphologies along the anterior posterior axis of the animal, with one Hox protein having most input over the morphology of the segment where it is prevalent.

A well-documented case of Hox direct transcriptional repression is the *Distal-less* (*Dll*) gene of *Drosophila*, which is required for the formation of the leg primordia. The formation of legs exclusively in the three thoracic segments of insects is achieved by Hox-mediated repression of leg development in the abdominal segments. This is shown by the appearance of a fourth pair of legs in the mutant *bithoraxoid* alleles that down-regulate *Ubx* expression in the first abdominal segment (A1) (Lewis 1963). Moreover, BX-C mutant embryos lacking *Ubx*, *abd-A* and *Abd-B* function develop leg primordia in every abdominal and thoracic segment as shown by ectopic *Dll* expression. The enhancer controlling *Dll* expression in the leg primordium is directly repressed by the three BX-C proteins (Vachon et al. 1992). Ectopic BX-C protein expression represses the activity of this enhancer in the thorax, while abolishing BX-C function in the abdomen allows its activation in all abdominal segments. The *Dll* enhancer is directly bound by *Ubx*, *Abd-A* and *Abd-B* proteins and mutation of the DNA sequences bound by the Hox proteins results in ectopic activation of the enhancer in all abdominal segments in the cells homologous to those that in the thorax form the leg primordia. *Dll* repression in the abdominal segments requires, besides the Hox proteins, the presence of the Engrailed and Sloppy paired segmentation proteins that act as necessary collaborators (Gebelein et al. 2004). Interestingly, *Abd-B*, that has a different DNA binding specificity than *Ubx* and *Abd-A*, binds to the same DNA site in the *Dll* leg enhancer, although *Abd-B* can bind in the absence of *Exd/Hth* (Sambrani et al. 2013) while *Ubx* and *Abd-A* cannot. Despite leg formation requiring other genes besides *Dll* (Estella et al. 2003), *Dll* regulation offers a good example of how Hox genes can control organogenesis by repression of their downstream targets.

An interesting parallel in vertebrate limb organogenesis occurs with the expression of the Tbx5 T-box transcription factor. Tbx5 is expressed in the forelimb primordium where it is necessary for the initiation of limb organogenesis and growth (Rallis et al. 2003; Minguillon et al. 2005). Localized Tbx5 expression in the lateral plate mesoderm (LPM) ultimately dictates where the forelimb will arise. A Tbx5 enhancer harboring several Hox binding sites drives expression in the lateral plate mesoderm region forming the forelimb (Minguillon et al. 2012). Mutation of the second Hox binding site results in ectopic enhancer expression. It has been shown that Hoxc8/9 and 10 proteins, that are expressed just posterior to where Tbx5 is normally activated, bind to this site and repress the enhancers' expression. Thus, posterior Hox genes contribute to the spatial restriction of anterior limb-bud organogenesis by regulating Tbx5 expression (Nishimoto et al. 2014). Interestingly, all the Hox binding sites in the enhancer are bound by Hox4 and Hox5 and in fact these proteins are required to activate the Tbx5 limb enhancer in its normal domain (Minguillon et al. 2012) showing that Hox proteins can act as activators and repressors of Tbx5.

12.3.2 *Hox Genes as Transcriptional Activators*

As described above, the localized activity of Tbx5 requires repression by posterior Hox8c, 9c and 10c but the expression of this enhancer also requires a direct positive input mediated by Hox4 and Hox5 (Minguillon et al. 2012). In *Drosophila*, several examples of directly activated targets during organogenesis exist (Mann et al. 2009), the most relevant for this review being Scr activating *fork head (fkh)* in the salivary gland primordium and Abd-B activating *empty spiracles (ems)* in the posterior spiracles.

Fork head (Fkh) encodes a transcription factor of the winged helix family. *fkh* is one of the earliest genes expressed in the salivary gland in *Drosophila* where it is required for cell survival, salivary gland cell invagination and expression of most salivary gland specific proteins. A *fkh* salivary gland enhancer has been isolated that is directly regulated by Scr (Zhou et al. 2001). Scr is active in the whole labial segment but *fkh* expression is only expressed in the gland primordium because the activity of various signaling pathways and Fkh auto-regulation act as additional activator and repressor elements restricting the enhancer function (Zhou et al. 2001). A fragment of this salivary gland enhancer (*fkh250*) contains a binding site for Scr/Exd heterodimer and null mutants for *Scr* or *exd* abolish *fkh250* expression. In vitro, Scr and Exd proteins can bind *fkh250* more efficiently when forming a complex. Mutation of either the Exd half-binding site or the Scr half-binding site abolishes the formation of a DNA heterodimer complex decreasing overall Scr binding to the fragment (Ryoo and Mann 1999).

The *empty spiracles (ems)* gene is another direct Hox target. Among other tissues, Ems is expressed in the spiracular chamber of the posterior spiracles where it is required for the organogenesis of this external respiratory organ (Hu and Castelli-Gair 1999). A posterior spiracle *ems* enhancer was isolated that contains several Abd-B binding sites that function additively and, when mutated, abolish spiracle expression (Rivas et al. 2013; Jones and McGinnis 1993). Ectopic Abd-B expression induces the ectopic activation of the *ems-spiracle* enhancer. In vitro, these binding sites are directly bound by Abd-B (Rivas et al. 2013). As with the *fkh* salivary gland enhancer, the *ems-spiracle* enhancer is not expressed in the whole Abd-B domain, but only in part of the dorsal A8 segment, indicating that its correct activation requires integrating segment positional information besides the Abd-B input.

More recently, a posterior spiracle enhancer of the *crumbs (crb)* gene directly regulated by Abd-B has been identified (Lovegrove et al. 2006; Pinto et al. 2015). This enhancer is interesting because despite being directly activated by Abd-B, its expression is delayed with respect to *ems*. Analysis of the *crb*-posterior spiracle enhancer (*crb518*) shows that early Abd-B protein expression cannot activate the spiracle specific element because of the presence of a repressor module in its vicinity. The repression is relieved when another transcription factor, STAT, binds to its target sites that are located between the repressor module and the Abd-B bound specificity element. Interestingly, STAT activation in the spiracle depends on

the expression of its ligand Unpaired (Upd), which is also activated in the posterior spiracles by Abd-B (Lovegrove et al. 2006). Thus, *crb* is a delayed-primary target of Abd-B because it requires for its activation Abd-B and an Abd-B downstream target. As a result, two direct Abd-B targets in the posterior spiracles are expressed with a different timing (Pinto et al. 2015).

12.4 The Embryonic Organogenetic Function of Hox Genes

In this section we will review the diverse functions Hox genes play during embryogenesis in the formation of most organs in *Drosophila*.

12.4.1 Salivary Gland Organogenesis

Scr is required for the formation of the salivary glands in the labial segment. Ectopic *Scr* expression induces ectopic gland formation in the head but not more posteriorly, due to the Teashirt (Tsh) and Abd-B proteins restraining *Scr* activity in the trunk and posterior segments (Andrew et al. 1994). Similarly, the restriction of the salivary gland primordia to the ventro-lateral side of the embryo is due to *Scr* gland induction being blocked by the dpp/TGF β pathway on the dorsal side (Henderson et al. 1999).

Scr induces salivary gland organogenesis through the activation of several genes, among others, *fork head* (*fkh*), *sage* and *CrebA* (Andrew et al. 1994; Panzer et al. 1992; Abrams and Andrew 2005; Abrams et al. 2006). To activate these target genes *Scr* requires its co-factors Hth and Exd. Before salivary gland primordia invagination (at st9–st10) Exd/Hth are also required for *Scr* transcriptional maintenance, however, after st10 *Scr* represses *hth* expression leading to the loss of *Scr* maintenance in the salivary gland cells just as the primordia start invaginating at st11 (Henderson and Andrew 2000). Thus, *Scr* is required only transiently for salivary gland formation and after st11 salivary gland organogenesis depends on the *Scr* targets. After *Scr* disappears from the primordia, the maintenance of *fkh* (encoding a FOX wing-helix family protein), *sage* (coding for an HLH protein) and *CrebA* is achieved through auto- and cross-regulation between these proteins. *Fkh* is required to maintain cell viability and to control gland invagination (Myat and Andrew 2000). *Fkh* interaction with Sage, a transcription factor that is exclusively expressed in the salivary glands, explains the localized activation of downstream target genes. *Fkh* and Sage targets include enzymes, secreted cargo and transmembrane proteins, while *CrebA* activates the secretory machinery. The fact that most of the Sage target genes identified through microarray analysis constitute terminally differentiated gene products has led to the suggestion that the salivary

gene cascade has very few levels. At the top of the hierarchy is *Scr/Exd/Hth* that activates the expression of transcription factors like *CrebA*, *Sage*, *Fkh* and *Hkb*, which maintain the salivary gland fate and function through auto-regulation and activation of the genes causing terminal differentiation (Fox et al. 2013).

12.4.2 Trachea Organogenesis

The tracheal tube network is formed from ten homologous ectodermal primordia located from the second thoracic to the eighth abdominal segment (T2-A8) (Fig. 12.3a). At st10 the tracheae primordia become determined when they activate the *trachealess* (*trh*), *ventral veinless* (*vvl*) and *knirps* (*kni*) genes. These genes encode transcription factors and are activated independently of each other in the tracheal primordia by Hox and JAK/STAT signaling activation and Wingless (WNT) pathway repression (see below). The tracheal primordia invaginate forming a transient tracheal pit, that sprouts five primary tracheal branches that either elongate towards the target tissues they oxygenate or fuse to the equivalent tracheal branches of neighboring segments forming the dorsal and lateral trunks linking the tracheal derivatives formed in the different segments into a continuous tubule network (Fig. 12.4; Chap. 6 this volume). Due to their homology, most of the primary branches formed in all segments are similar. However, as a result of their terminal localization, the T2 and A8 tracheal pits generate many unique branches. The most diverse branching pattern arises from the T2 tracheal pit, that cannot fuse to anterior trachea and forms branches oxygenating the head (Manning and Krasnow 1993). The A8 tracheal pit branches are also unique, as they do not fuse to posterior tracheal branches and connect to the posterior spiracles forming the only external opening of the tracheal system in the early larva.

Depending on the segment, the tracheal pits express either the *Antp*, *Ubx*, *abd-A* or *Abd-B* Hox genes (Fig. 12.2). The first indication that tracheal organogenesis is regulated by Hox genes was the observation that the dorsal trunk linking all the tracheal sections does not form in BX-C mutants (Lewis 1978). The dorsal trunk is formed by the fusion of the posterior dorsal trunk (pDT) branch with the anterior dorsal trunk (aDT) branch of adjacent segments, giving rise to a continuous tube connecting all tracheae. The most anterior pit in T2 (Fig. 12.4b) only forms a pDT branch, and the equivalent to the aDT branch forms the pharyngeal branch (PB) and the cerebral branch (CB) (Manning and Krasnow 1993).

The development of either an aDT or a cephalic branch is controlled by the BX-C genes (Matsuda et al. 2015). The formation of a specific cerebral branch in T2 but not in posterior segments is due to the expression of the *unplugged* (*unpg*) gene in the anterior dorsal T2 tracheal pit. *Unpg* is a homeodomain transcription factor expressed in several tracheal branches. Ventrally, *unpg* is expressed and required for the ganglionic tracheal branches (GB) formed in T2-A8. However, dorsally, *unpg* tracheal expression is repressed in T3-A8 by the BX-C proteins, restricting its dorsal expression to the cells forming the T2 cerebral branch (Chiang

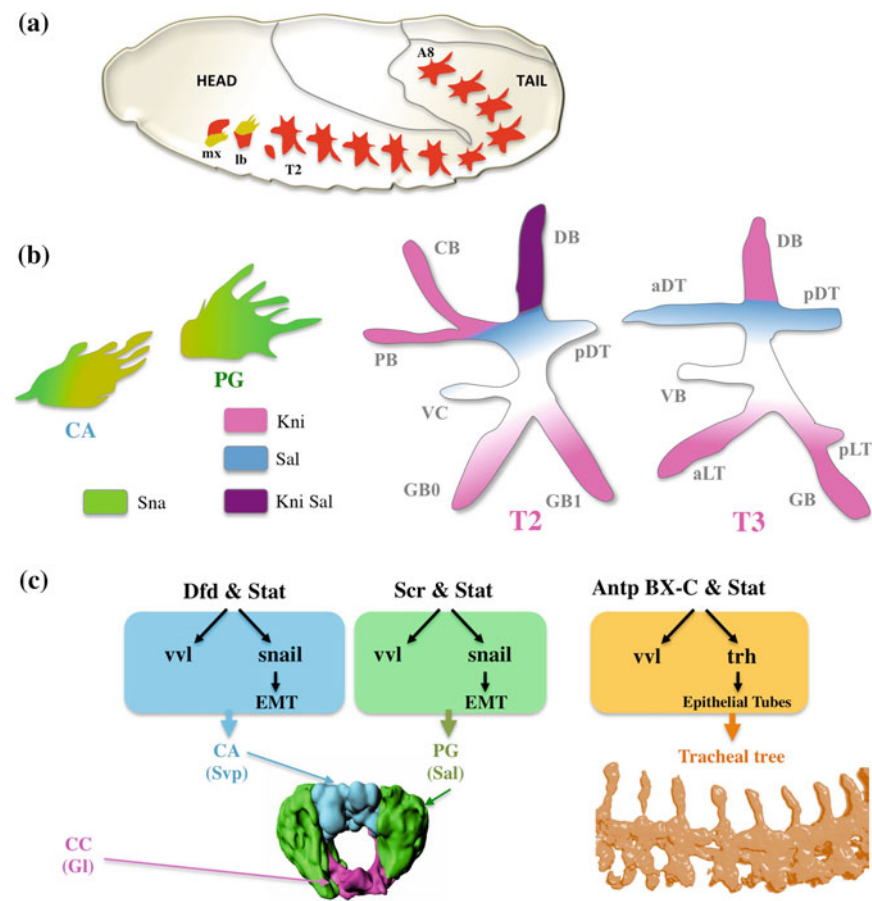


Fig. 12.4 Ring gland and trachea primordia. **a** Scheme showing the trachea, the corpora allata and prothoracic gland primordia positions as indicated by the expression of *vvl* (red) and *sna* (green, represented as yellow to indicate overlap with red staining). **b** Scheme showing the different migratory behaviors of the corpora allata, the prothoracic glands and the trachea (only the tracheal derivatives in T2 and T3 segments are shown). The CA and the PG have a mesenchymal collective cell migration behavior. The trachea cells migrate maintaining their epithelial organization. T2 has specific branches not present in T3. Colors represent the specified gene expression patterns. **c** STAT interacts with different Hox proteins to specify different organs. A frontal view of a ring gland after coalescence and a lateral view of the tracheal tree are shown. mx, maxilla; lb, labium; T2, second thoracic segment; A8, eighth abdominal segment. CA corpora allata; CC corpora cardiaca; PG prothoracic glands. CB cerebral branch; DB dorsal branch; pDT posterior dorsal trunk; aDT anterior dorsal trunk; aLT anterior lateral trunk; pLT posterior lateral trunk; GB ganglionic branch; PB pharyngeal branch; VB visceral branch; VC ventral cephalic branch

et al. 1995). Mutation of the BX-C genes results in the activation of *unpg* in the anterior dorsal cells of all tracheal pits leading to the formation of cerebral-like tracheal branches in all segments with the concomitant disappearance of the

homologous aDT branch and the absence of a continuous dorsal trunk (Chiang et al. 1995). It is not yet known if *unpg* repression by the BX-C proteins is direct, as the enhancer controlling its dorsal tracheal expression has not been found.

Analysis of branch specific gene expression in the T2 tracheal pit shows that besides *unpg*, other tracheal genes are differentially regulated in the cerebral branch compared to the homologous aDT branch of posterior tracheal pits. In the central pits, the formation of the aDT and pDT branches requires *spalt* (*sal*), while formation of the dorsal branch requires *knirps* (*kni*) function (Chen et al. 1998). Despite being homologous to the aDT, the cerebral branch expresses *kni* but not *sal*. The activation of *kni* in the cerebral branch is mediated by Hedgehog (Hh) pathway activity in T2 (Matsuda et al. 2015). Although *hh* is expressed in all trunk segments in a similar temporal and spatial pattern, the BX-C proteins prevent, by unknown mechanisms, the Hh pathway from activating *kni* in T3-A8 aDT (Matsuda et al. 2015). Thus, dorsal trunk formation requires the Hox genes to block the Hh-pathway's mediated activation of *kni* in T3-A8 to allow aDT specification.

Dorsal trunk fusion depends on the presence of several specialized cells: first, the fusion cells present at the tip of both the aDT and the pDT branches (Samakovlis et al. 1996; Jiang and Crews 2003), and second, the bridge cells formed by the mesoderm abutting the pDT branch (Wolf and Schuh 2000). Fusion cells are tracheal cells that can be distinguished by their expression of the *dysfusion* (*dys*) gene (Jiang and Crews 2003). In BX-C mutants, due to the transformation of the aDT to a cerebral branch, the tracheae lack an aDT *dys*-expressing fusion cell, explaining the lack of tracheal fusion among segments (Matsuda et al. 2015). In contrast, bridge cell formation requires Hth/Exd function but surprisingly does not require BX-C input (Merabet et al. 2005a).

The BX-C genes can also control the trachea diameter. Dorsal trunk diameter correlates with the expression levels of *Sal* that increase towards the posterior. Induction of higher *Sal* levels in the anterior dorsal trunk causes the enlargement of its diameter. Mutants for BX-C genes decrease *Sal* levels in the dorsal trunk, which results in a reduction of its diameter. Conversely, over-expression of the posterior Hox genes produces the opposite effect (Matsuda et al. 2015). Thus, it is possible that increased *sal* expression mediated by BX-C proteins is responsible for the enlarged posterior trunk.

Ubx requirement has also been found in the trachea at larval stages. Most larval tracheal cells are polyploid and do not contribute to the adult tracheal system. During metamorphosis, polyploid tracheal cells die and are replaced by the diploid imaginal cells that have been set aside in the spiracular branches during embryogenesis. The only exception to this is found in the T3 larval tracheal derivatives that do not become polyploid and restart the normal proliferative cycle at metamorphosis contributing to the adult's respiratory system. The *Ubx*/Hth/Exd complex is responsible for the maintenance of T3 cells in a non-polyploid state. At the moment it is unclear why the A1 trachea is polyploid despite also expressing *Ubx* (Sato et al. 2008).

It is not known why tracheal specification only occurs in segments T2-A8. Some results suggest Hox genes may influence tracheal pit specification, as ectopic expression of either *Antp*, *Ubx*, *Abd-A* or *Abd-B* is sufficient to activate *trh* in the

maxilla, labium and T1 segments (Sánchez-Higueras et al. 2014). Formation of trachea-like tubes is also observed in *sal* mutant embryos, which cause ectopic *Ubx* and *trh* expression anterior to T2 (Sánchez-Higueras et al. 2014; Castelli-Gair 1998; Casanova 1989). Although *vvl* is normally expressed in the Mx, Lb and T1 segments in a few cells at homologous positions to those forming the trachea in T2-A8 (Fig. 12.2), ectopic expression of *Antp*, *Ubx*, *Abd-A* or *Abd-B* enlarges its expression domain to resemble that corresponding to the tracheal primordia. Early *vvl* expression in the T2 pit and activation of the *vvl* early tracheal enhancer *vvlI+2* disappears in *Scr Antp* double mutant embryos, confirming Hox input is necessary for the activation of some tracheal specific genes during early development. Surprisingly, *trh* expression is not affected in *Scr Antp* double mutant embryos, indicating that although ectopic Hox expression can activate *trh* transcription, there are redundant regulators capable of activating *trh* expression in the absence of Hox input (Sánchez-Higueras et al. 2014).

12.4.3 *Corpora Allata and Prothoracic Gland Organogenesis*

The corpora allata and the prothoracic endocrine glands synthesize, respectively, Juvenile Hormone and Ecdysone, the main hormones controlling molting and metamorphosis in insects. These endocrine organs develop from *vvl*-expressing cephalic cells located at homologous positions to those forming the trachea in the trunk segments (Fig. 12.2). Corpora allata specification on the maxillary segment depends on *Dfd* expression, while prothoracic gland specification on the labium requires *Scr*. Ectopic expression of *Dfd* can induce corpora allata in the T2-A8 tracheal primordia, while *Scr* ectopic expression induces prothoracic glands. As described in the previous section, ectopic *Antp*, *Ubx*, *Abd-A* or *Abd-B* expression induces the formation of trachea in the cephalic segments from the same *vvl* expressing cells that give rise to the gland primordia. This suggests that both organs develop from a metamerically repeated primordium that can develop as either trachea or gland depending on the segment's Hox input (Sánchez-Higueras et al. 2014).

During early development, the gland primordia activate *vvl* using the same *vvlI+2* enhancer driving early *vvl* tracheal expression (Fig. 12.2). Thus early *vvl* expression occurs in a repeated pattern along the trunk from the maxillary segment in the head to the ninth abdominal (A9) segment, in a region expressing six different Hox genes (*Dfd*, *Scr*, *Antp*, *Ubx*, *abd-A* and *Abd-B*). The metameric activation of *vvlI+2* in each segment is regulated by JAK/STAT signaling and by the predominant Hox gene expressed in that segment (Sánchez-Higueras et al. 2014; Sotillos et al. 2010). The expression of *vvl* in the maxilla is activated by *Dfd* and STAT, in the labium by *Scr* and STAT, while in the second thoracic segment by *Antp* and STAT (Fig. 12.4c). Any Hox protein is sufficient to activate the *vvlI+2* enhancer

independently of the segment where it is expressed. For example, in a *Dfd Scr* double mutant, where the expression of *vv1+2* is absent from the maxilla and the labium, the ectopic expression of either Antp, Ubx, Abd-A or Abd-B in these segments can rescue the activity of *vv1+2*. This shows that these Hox proteins function as general activators of the early metameric pattern of *vv1* expression (Sánchez-Higueras et al. 2014).

Despite the common function of Hox input on *vv1* activation, the fate of the *vv1+2* expressing cells depends on the Hox protein they express. *Dfd* and *Scr* induce the activation of the *snail* (*sna*) gene in the endocrine gland primordia but, interestingly, *sna* is activated in the maxilla on the most ventral cells of the *vv1* patch, while *Scr* activates *sna* in the most dorsal cells, indicating that the Hox proteins must collaborate with genetic elements providing the dorso-ventral positional information (Fig. 12.2). Besides being required for *vv1* and *sna* activation, *Dfd* specifies the gland as corpora allata activating directly or indirectly the Seven-up (*Svp*) orphan nuclear receptor transcription factor, while *Scr* activates in the prothorathic glands *sal*. Once the corpora allata and the prothoracic gland primordia express *Sna*, the cells experience an Epithelial to Mesenchymal Transition, become migratory and coalesce into a single cluster. This cluster formed by the coalescence of both glands moves posteriorly and dorsally, where it first joins another endocrine organ, the corpora cardiaca, and then fuses to the contralateral primordium contributed by the other side of the embryo forming a structure surrounding the anterior aorta. This complex structure, emerging from the fusion of the three main insect endocrine organs, typical of Cyclorrhaphan flies, is known as the ring gland (Fig. 12.4).

Dfd and *Scr* are only expressed at early stages in the corpora allata and the prothoracic glands, being turned off once the primordia become migratory. Thus, in this respect, these endocrine glands are more similar to the salivary glands, where Hox requirement is transient, than to the trachea, where Hox expression is maintained. At present, there is no indication that the *labial* and *proboscipedia* genes play a role in ring gland formation.

12.4.4 Posterior Spiracle Organogenesis

Spiracles are the external respiratory structures connecting the insect's tracheal network to the external environment. Immediately after hatching, the only functional spiracles in the *Drosophila* larva are the posterior spiracles, induced in the dorsal side of the A8 segment by the *Abd-B* gene (Hu and Castelli-Gair 1999). During embryogenesis, the *Abd-B* protein is expressed in two temporal waves. *Abd-B* first appears broadly at st10 in PS13-14 (A7p, A8 and A9a segments) where high levels of expression are maintained during development (Fig. 12.2d). Slightly later, at st11, *Abd-B* becomes activated in A7-A5 (Celniker et al. 1989; Delorenzi and Bienz 1990; Boulet et al. 1991). Forced ectopic expression of *Abd-B* in the ectoderm segments anterior to A8 can induce them to form posterior spiracles only

if the ectopic Abd-B is expressed between 3 and 5 h of development, indicating that the ectodermal cells have a window of competence after which spiracle organogenesis cannot be activated (Castelli-Gair 1998). The expression of Abd-B in the A5-A7 segments after their loss of spiracle activation competence explains why posterior spiracles do not form anterior to A8, but it does not explain why spiracles do not form in A9. The observation that A9 expresses a shorter Abd-B isoform (Abd-Br) and A8 a long isoform (Abd-Bm) cannot explain the absence of spiracle in A9, as when expressed ectopically both isoforms are capable of inducing posterior spiracles in anterior segments (Rivas et al. 2013; Castelli-Gair et al. 1994; Kuziora 1993; Lamka et al. 1992). Spiracle formation is probably blocked by a gene expressed in A9, as neither forced expression of the Abd-Bm nor the Abd-Br isoform can induce spiracle development in A9.

The posterior spiracle can be subdivided in two parts: an internal spiracular chamber that forms a filter known as *filzkörper* and connects to the trachea; and the stigmatophore, the protruding external structure where the *filzkörper* is lodged (Hu and Castelli-Gair 1999). *Abd-B* induces spiracle formation through the transcriptional activation of several genes including the transcription factors encoded by the *ems*, *cut* (*ct*) and *sal* genes and the JAK/STAT signaling pathway ligands *upd* and *upd2*. Mutants for these genes form abnormal spiracles missing either the spiracular chamber, the stigmatophore or both. Embryos simultaneously mutant for the *ct*, *ems*, *grain* (*grn*) [a GATAc gene downstream of the *sal* gene in the stigmatophore] and the JAK/STAT receptor *dome* lack the posterior spiracles, indicating they are key for spiracle organogenesis (Lovegrove et al. 2006). The early activation of these spiracle genes suggests they are direct Abd-B targets although this is only proven for *ems* (Rivas et al. 2013; Jones and McGinnis 1993). These Abd-B targets are activated either in the spiracular chamber or in the stigmatophore primordia when the spiracle primordia is still forming an epithelial sheet on the surface of A8, showing the basic spiracle patterning occurs before the organogenetic movements start. *ct*, *ems* and *upd* are transcribed in the cells that will contribute to the internal spiracular chamber, whereas *sal* is transcribed in the surrounding cells that will contribute to the stigmatophore. These Abd-B primary targets regulate the transcription of downstream genes. For example, *Sal* regulates *grn* in the stigmatophore, *STAT* up-regulates the transcription of *crb* and *Ct* represses the expression of the proapoptotic gene *reaper* (Lovegrove et al. 2006; Zhai et al. 2012).

The activation of these primary targets exclusively in a region of the dorsal part of A8 suggests that besides the Abd-B transcriptional input, their enhancers also integrate dorso-ventral and antero-posterior intrasegmental cues. Interestingly, the initial common reiterative intrasegmental cues required for forming and maintaining embryo segmentation are also regulated by *Abd-B*. Although initially A8 looks morphologically similar to more anterior segments, Abd-B activity modifies in A8 the expression of the genes setting the intrasegmental cues by reshaping the expression of *hedgehog* (*hh*), *wingless* (*wg*) and *rhomboid* (*rho*), thus creating unique A8 positional values (Merabet et al. 2005b). This reorganized signaling pathway activity in A8 is fundamental to control various different cellular events during posterior spiracle organogenesis (Maurel-Zaffran et al. 2010). Abd-B

activation of Upd and Upd2 ligands in the spiracular chamber primordium induces JAK/STAT signaling both in the internal spiracular chamber and in the surrounding stigmatophore cells, as shown with the x10STAT-GFP reporter gene (Hombria and Sotillos 2013; Bach et al. 2007). Recently, it has been shown that STAT feeds back on *Abd-B* expression starting the conversion of the early Hox gene cascade into a gene network (Pinto et al. 2015).

The spiracular chamber cells and the stigmatophore cells activate different morphogenetic cellular mechanisms during development. The spiracular chamber cells induce apical actin cytoskeletal contraction that leads to their invagination and this is followed by a four-fold elongation of the apico-basal axis of the invaginated cells. The surrounding stigmatophore cells, instead, go through a process of epithelial cell rearrangement that changes the relative position of neighboring cells through convergent extension (Hu and Castelli-Gair 1999; Brown and Castelli-Gair Hombria 2000; Castelli-Gair Hombria et al. 2009). Among the genes expressed in the posterior spiracles, the RhoGef2, RhoGef64C and RhoGAP Crossveinless-c (Cv-c) proteins control cytoskeletal contraction and cell invagination through the modulation of the small Rho1 GTPase activity (Simões et al. 2006). Small GTPases are inactive when bound to GDP and active when bound to GTP. GEF proteins activate Rho1 by extracting the GDP and allowing Rho1 to bind GTP. GAP proteins inactivate Rho1 by enhancing its natural GTPase activity and accelerating the transformation of active Rho1-GTP into inactive Rho1-GDP. RhoGef2 is expressed ubiquitously in the embryo and its morphogenetic function is regulated by the protein's translocation from the basal to the apical side of the cell where it induces cytoskeletal contraction and cell invagination as shown in mesoderm development (Kolsch et al. 2007). Similarly, in the A8 ectoderm RhoGef2 localizes basally except in the posterior spiracles where it translocates apically in the invaginating cells. Instead, RhoGef64C is regulated through localized transcriptional activation in the posterior spiracles downstream of *Abd-B*. *RhoGef64C* mRNA localizes apically probably increasing the translated protein concentration in the apical cortex (Simões et al. 2006). RhoGAP Cv-c is also transcriptionally regulated in the spiracle by the *Abd-B* cascade. In contrast to the apical localization of RhoGEF2 and RhoGef64C proteins, RhoGAP Cv-c localizes to the basolateral membrane. The complementary localization of these GEF and GAP regulators in the spiracle cells induces increased levels of the active Rho-GTP in the apical cortex, locally activating apical Rok and MyosinII light regulatory chain localization, that cause apical actin polymerization and contraction. Mutation of the Rho GTPase or of its GEF and GAP regulators, results in abnormal spiracle invagination, linking Hox expression with cell invagination during organogenesis (Simões et al. 2006).

Stigmatophore development requires Sal activation of *gm*, the GATAc transcription factor. In *gm* mutants, incomplete cell rearrangements result in the abnormal development of the stigmatophore. Interestingly, legs carrying large *gm* mutant clones show abnormal shapes due to incomplete cell rearrangements during leg extrusion, suggesting GATAc may regulate convergent extension in several tissues (Brown and Castelli-Gair Hombria 2000).

The Tek kinase Btk29A is also expressed at high levels in the spiracular chamber and in the stigmatophore. In embryos mutant for this kinase the spiracular chamber

cells located most distal to the trachea do not invaginate. Surprisingly, this phenotype is not due to Btk29A requirement in the spiracular chamber, as the defect is rescued by Btk29A expression in the stigmatophore but not in the spiracular chamber. This observation could suggest that cell rearrangements in the stigmatophore exert a force that helps completing spiracular chamber invagination (Tsikala et al. 2014). The absence of a cell autonomous phenotype in the spiracular chamber despite the high levels of Btk29A protein expressed could be due to redundancy with other kinases, like the Src42A or Src64B kinases, active in the spiracles (Sotillos et al. 2013); or alternatively be due to the presence of some remaining maternal Btk29A protein that was not removed in these experiments (Tsikala et al. 2014).

The posterior spiracles express E-cadherin (E-cad) and several non-classical cadherins (lacking the β -catenin interaction domain): *cad86C*, *cad96C*, *cad74A* and *cad88C*. These cadherins are expressed in different subsets of spiracle cells, suggesting the Abd-B transcriptional cascade provides the spiracle with a mosaic expression of adhesion molecules that facilitate spiracle assembly (Lovegrove et al. 2006). Although the classical E-cad is expressed ubiquitously in the embryonic ectoderm, antibody staining detects higher E-cad concentration in the posterior spiracles probably due to increased protein recycling (Sotillos et al. 2013). Mutations affecting E-cad levels cause occasional spiracle invagination defects that are more frequent when the levels of non-classical cadherins decrease, indicating certain degree of functional redundancy (Simões et al. 2006).

The *crb* gene is expressed ubiquitously in the ectoderm where it is required to maintain the apico-basal cell polarity (Wodarz et al. 1995). The posterior spiracles express higher levels of Crb driven by a spiracle specific enhancer regulated by Abd-B and STAT (Lovegrove et al. 2006; Pinto et al. 2015). The need for higher levels of Crb protein in the posterior spiracles has been suggested to be necessary to prevent the loss of apico-basal polarity caused by Rho1 activation in the spiracle cells (Sotillos et al. 2013). High Crb levels may also help the reorganization of apico-basal membranes during the invagination and elongation of the spiracular chamber cells (Lovegrove et al. 2006).

12.4.5 *Oenocyte Organogenesis and Its Relation to Chordotonal Organogenesis*

The oenocytes are clusters of six lipid-processing ectodermal cells formed exclusively in the A1 to A7 segments. Oenocyte specification requires *abd-A* gene function, thus explaining its segmental localization but, surprisingly, *abd-A* is not required in the oenocyte progenitor cells but in the neighboring dorsal chordotonal organs.

Chordotonal cells are proprioceptor sensory organs whose segmental pattern of localization is under Hox regulation (Heuer and Kaufman 1992). Five primary

chordotonal organ precursors form in each segment along A1–A7. These primary precursors signal to the overlying ectodermal cells through the EGF pathway to recruit three additional secondary chordotonal organ precursors. Interestingly, the most dorsal chordotonal primary precursor (C1) induces oenocytes instead of secondary chordotonal precursors. The different response to the EGF signal is due to the expression of *sal* in the receiving ectodermal cells. In *sal* mutant embryos, C1 overlying cells do not form oenocytes giving rise to additional chordotonal organs (Elstob et al. 2001).

EGF-pathway activation in both the oenocytes and secondary chordotonal precursors is mediated by the Spitz ligand. Spitz is expressed ubiquitously in the embryo in an inactive form and its secretion requires Spitz cleavage in the Golgi by the Rhomboid protease (Lee et al. 2001). Abd-A mediates the transcriptional activation of *rhomboid* (*rho*) in the C1 chordotonal precursor, which allows EGF secretion that, indirectly, results in the induction of oenocytes. The *rho* cis-regulatory region contains an Abd-A dependent enhancer driving expression exclusively in the C1 chordotonal precursor. This enhancer contains a module with a binding site for Abd-A and its cofactors Exd/Hth that can mediate *rho* activation. Mutant embryos for Hth or Abd-A lack *rho-C1* enhancer expression. As expected, mutation of the Abd-A site in the enhancer also suppresses *rho-C1* expression but, surprisingly, mutation of the Hth or the Exd sites not only does not eliminate the enhancer's expression but results in the enhancer becoming active in the homologous thoracic chordotonal precursors even though they do not express Abd-A. This unexpected result is explained by the overlap of the Hth and Exd binding sites with the binding site of the Senseless repressor protein. The *rho-C1* enhancer is thus under a double regulation: Senseless binding blocks the *rho* enhancer's expression in the dorsal C1 sensory precursors, except in the abdomen where Senseless cannot bind its site due to the Exd/Hth/Abd-A complex occupying an overlapping site. Mutation of the Hth binding site also affects the Senseless site and as a result the *rho-C1* enhancer is derepressed in all segments, including those that do not express Abd-A. In fact, when the enhancer is mutant for the Senseless site its expression is not affected by mutation of the Abd-A site. Hth and Exd function by recruiting or stabilizing Abd-A to its *rho-C1* enhancer binding sites. Abd-A, in turn, stabilizes Hth/Exd binding to the Senseless overlapping sites, displacing Senseless. This equilibrium can be shifted by creating a Senseless higher affinity site. In these conditions, the *rho-C1* enhancer is inactive in the abdominal segments due to the inability of the Abd-A/Hth/Exd complex to displace the repressor. These results show that Abd-A is only permissive for *rhomboid* expression and not instructive (Li-Kroeger et al. 2008). The *rho-C1* enhancer also contains a Pax2 binding site close to the Exd/Hth/Abd-A sites which increases *rho* transcription, indirectly increasing EGF signaling as judged by the formation of fewer oenocytes when the Pax2 function is perturbed (Li-Kroeger et al. 2012).

This is one of the few cases where Hox genes are not required cell autonomously in the organ they induce. However, as Abd-A is expressed in the oenocytes it is possible it may have a cell autonomous late requirement that has not yet been detected.

12.4.6 Gonadal Organogenesis

Gonads are specialized organs that provide the niche required for germ cell maintenance and gamete development. In *Drosophila*, the support cells and gonadal niche are mesodermal cells that require *abd-A* and *Abd-B* Hox genes for their correct specification.

The niche and the stem cells localize at the anterior end of the gonads. When a germ cell divides, the descendant remaining in contact with the niche maintains its stem cell character, while its sibling becomes a gonialblast that is enveloped by mesodermal support cells that promote its maturation. As the gametes mature, they are displaced from the anterior end of the gonad by the production of additional gonialblasts. Although Hox genes are required for male and female gonad organogenesis, their involvement in testis organogenesis has been studied more extensively.

The somatic gonadal mesoderm precursors and the germ cells form at separate embryonic locations. The germ cells originate at the posterior end of the blastoderm from where they migrate into the embryo joining a few hours later the gonadal mesoderm formed in the abdominal PS10-13 (Santos and Lehmann 2004). The gonadal mesoderm in PS10-12 is formed by cells homologous to those that in more anterior parasegments give rise to primary fat body precursors (Fig. 12.3b labeled as GM or FB1 respectively; PS13 gonadal precursors arise from non homologous cells and are not labeled) (Brookman et al. 1992; Boyle and DiNardo 1995).

Gonadal mesoderm cells in PS10-11 express only *abd-A*, in PS12 express both *abd-A* and *Abd-B* and in PS13 express *Abd-B* exclusively (Boyle and DiNardo 1995; DeFalco et al. 2004). When the germ cells meet the PS10-12 gonadal mesoderm primordia, they become enveloped by it and coalesce into a spherical gonad primordium located in A5. PS13 mesodermal derivatives only join the male gonad, as in the female this primordium becomes apoptotic and disappears.

The decision to become gonadal mesoderm instead of primary fat body depends on Hox function. *Abd-A* allows the formation of gonadal mesoderm in PS10-12 by repressing the expression of *serpent* (*srp*), a gene encoding the GATAd transcription factor that induces fat body development. In *abd-A* mutants, where the gonadal mesoderm develops as fat body, the germ cells are unable to associate with the mesoderm and die. Ectopic expression of *abd-A* in the mesoderm results in the formation of gonadal mesoderm in the anterior segments (Greig and Akam 1995). *Abd-A* ectopic expression transforms exclusively the primary fat body precursors into somatic gonadal precursors and not other fat body precursors, confirming that only primary fat body and gonadal mesoderm are metameric homologous primordia (see below). The observation that in *srp* mutants excessive somatic gonadal precursors develop independently of *abd-A* expression, suggests that *Abd-A* function for gonadal mesoderm development is permissive through the repression of *srp*, which otherwise would repress gonadal mesoderm allowing fat body development (Riechmann et al. 1998; Moore et al. 1998). *Abd-A* repression of *srp* is probably indirect (Riechmann et al. 1998). After coalescence, *abd-A* gonadal expression

levels decrease except from the cells ensheathing the gonad, suggesting a secondary function for *Abd-A* in this cell type (Boyle and DiNardo 1995).

Abd-B has different functions in PS12 and in PS13 gonadal mesoderm. In PS12 male and female gonads, *Abd-B* activates *Eyes absent* (*Eya*) expression. The differential expression of *Eya* in PS11 versus PS12 provides the first indication of antero-posterior regionalization in the gonad mesoderm that will result in the localized formation of the niche in the anterior non-*AbdB* expressing part of the gonadal mesoderm (Boyle and DiNardo 1995). In the testis, besides *Eya*, *Abd-B* also activates the transcription of *sevenless* (*sev*), encoding a receptor tyrosine kinase (Kitadate et al. 2007) that is also necessary for the restriction of the niche to the anterior part of the gonad. By late embryogenesis, the testis niche, known as the hub, starts to activate the adult hub specific genes *escargot* (*esg*), *upd*, *E-cad* and *N-cad* in the cells that do not express *Abd-B*. The exclusion of hub gene expression from the posterior gonadal cells is mediated by *Abd-B* through the regulation of the *Sev* receptor tyrosine kinase pathway. The ligand of *Sev*, *boss*, is expressed in all germ cells from where it is secreted to the surrounding gonadal mesoderm but the pathway can only be activated in PS12 mesoderm where *Abd-B* activated *Sev* transcription. Mutants for *Sev*, *Abd-B* or lacking pole cells, have hub gene expression expanded into the PS12 gonadal mesoderm (Kitadate et al. 2007). In ovaries, where no signs of differentiation can be observed at late embryogenesis (Le Bras and Van Doren 2006), it is yet unclear whether *abd-A* or *Abd-B* have a direct input on ovary niche localization.

In the PS13 gonadal mesoderm *Abd-B* has a very different function. These somatic mesodermal cells give rise to the testis male-specific Somatic Gonad Precursors (msSGPs) that, as previously mentioned, originate from a distinct metameric population to those forming the PS10-12 gonadal mesoderm. *Sox100B* (the homolog of mammalian *Sox9*, that is also expressed in testis) is expressed in the msSGP, under the control of *Abd-B*. Initially, the msSGPs are determined in both male and females but the female primordium dies by apoptosis induced by the female sex determination genes. If apoptosis is prevented in the female, the surviving *Sox100B Abd-B* expressing cells join the posterior ovary as they normally do in the male gonad. Ectopic *Abd-B* expression induces ectopic *Sox100B*-expressing msSGP-like cells in segments anterior to PS13 although, as ectopic *Abd-B* represses *abd-A*, and this abolishes normal gonad formation due to its transformation into primary fat body, it is not possible to determine in this genotype if the ectopic msSGPs are functional. However, functionality can be determined after *Abd-B* and *abd-A* are induced simultaneously. In these embryos, the gonadal mesoderm is formed and the ectopic msSGPs induced by *Abd-B* integrate with it (DeFalco et al. 2004). In summary, *abd-A* has an important function in allowing gonadal mesoderm formation in PS10-12 by preventing fat body development, while *Abd-B* is important to regulate the formation of different somatic mesoderm cell types in the antero-posterior gonadal axis to position the niche correctly.

After the male stem cell niche is specified during embryogenesis, niche positioning in the larva still requires *Abd-B* function. This new function of *Abd-B* is not cell-autonomous. In the larva, *Abd-B* is not expressed in the somatic mesoderm

cells but in the spermatocytes, which are germ cell descendants. Here *Abd-B* controls *Src42A* and *Sec63* that regulate *Sev/Boss* trafficking. In *Abd-B* mutants, abnormal *Sev/Boss* function affects integrin localization and testis rigidity that may be the cause for the observed hub misplacement (Papagiannouli et al. 2014). It is interesting that the same players required for embryonic hub specification are used in different cell types and with a different relationship to maintain hub localization at a later stage.

12.4.7 Fat Body Organogenesis

The fat body is formed in PS4-PS13 by the coalescence of various independent primordia that fuse among themselves and to those in adjacent parasegments, resulting in a single organ that extends along each side of the embryo. In a typical parasegment there are three fat body primordia on each side, all of which activate expression of the *serpent* gene. The primary dorsolateral primordium (FB1) appears first, followed by two secondary primordia, one dorsolateral (FBD) and another ventral (FBV) (light and dark-green pentagons in Fig. 12.3b). The specification of the dorsolateral primordia requires *engrailed* (*en*) and *hedgehog* (*hh*) function, while the ventral primordium requires *wingless* (*wg*) (Riechmann et al. 1998). In PS13 a different fat body primordium appears. The specification of this primordium requires *Abd-B* and *decapentaplegic* (*dpp*) input. This contrasts with the fact that fat body specification in PS4-12 is repressed by *dpp*. Why in PS13 there is a different response to *Dpp* signaling is unknown. Tinman (*Tin*) is required for the formation of the fat body in PS13, showing that it is involved in the regionalization of the dorsal mesoderm by Hox genes (Riechmann et al. 1998).

As mentioned in the previous section, in PS10-12 *abd-A* allows the development of gonadal somatic mesoderm instead of FB1 through down regulation of *srp* in the dorso-lateral primary fat body. At the moment it is unknown why *Abd-A* does not repress fat body formation in the secondary primordia of PS10-12 (Riechmann et al. 1998; Moore et al. 1998).

Hox genes are expressed in the larval fat body, where several Hox proteins can be co-expressed in a single cell. For example, *Dfd* is expressed in the most anterior fat body cells, but these cells also express *Ubx* and *Abd-B* (Banreti et al. 2014). This generalized lack of Hox antero-posterior expression segregation has not been found in any other tissue. The fat body is maintained through larval development until metamorphosis, when Ecdysone induces its autophagy. Hox genes are required to prevent autophagy in the larval fat body and probably have no role in its antero-posterior differentiation. Ecdysone triggers Hox expression down-regulation in the fat body prior to autophagy and it has been observed that maintained Hox expression blocks this process, suggesting Hox proteins act as temporal inhibitors of autophagy. Hox activity can also inhibit starvation-induced fat body autophagy in *Drosophila* and in vertebrate COS-7 cells, indicating that this could be a Hox general function (Banreti et al. 2014).

12.4.8 Heart Organogenesis

As other arthropods, *Drosophila* has an open cardiovascular system. The larval circulatory system is formed by a longitudinal dorsal vessel running from T1–A7. The dorsal vessel can be subdivided into three regions, the anterior aorta (AA, segments T1–T3), the posterior aorta (PA, A1–A4) and the heart (HT, segments A5–A7). The posterior end of the heart is closed, with the haemolymph (as the insect's blood is known) entering the heart from the body cavity through three pairs of valves (ostiae) present in each segment. The heart pumps the haemolymph to the aorta from where it exits back into the body cavity through the aorta's anterior opening. This antero-posterior organization is regulated by Hox gene function.

The dorsal vessel primordium arises in T1 to A7 from the dorsal mesoderm cells that receive the Wingless signal secreted from the overlying ectoderm (Fig. 12.3b pink rectangles). These groups of cells coalesce into a continuous band and the most dorsal cells experience a Mesenchymal to Epithelial Transition (MET), become cuboidal and join as a single longitudinal row of cells that become cardiomyocytes. The remaining cells that are not specified as cardiomyocytes form the lymph gland and the pericardial cells (Fig. 12.5). The cardiomyocyte rows formed on each side of the embryo move dorsally following the ectoderm as it closes and meet at the dorsal midline where they form the lumen of the dorsal vessel (Swope et al. 2014; Tao and Schulz 2007; Medioni et al. 2009; Bryantsev and Cripps 2009).

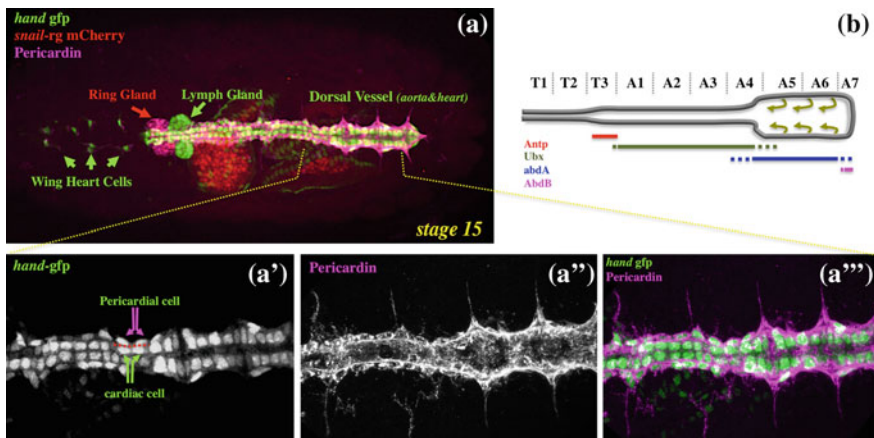


Fig. 12.5 Aorta, Heart and Lymph gland primordia. Dorsal view of an embryo triple stained with *hand-GFP*, *sna-rg-mCherry* and anti-Pericardin. Hand-GFP (green) labels the lymph gland, the aorta and heart cardioblasts as well as the surrounding pericardial cells. Pericardial cells secrete Pericardin to the extracellular matrix. The ring gland encircles the most anterior aorta just anterior to the lymph gland. **a'–a'''** close-up of A3–A6 where the expanding lumen of the heart can already be appreciated in comparison with the aorta. **b** Schematic representation of the three dorsal vessel regions and the Hox expression. Arrows in **b** represent haemolymph flow

Each segment in the dorsal vessel contributes six pairs of cardiomyocytes on each side, except segments in the anterior aorta that only contribute four pairs. Different types of cardiomyocytes can be distinguished in each segment by the expression of particular transcription factors. The T1-T3 cardiomyocytes forming the anterior aorta can be distinguished because they express *Hth*, do not express *Svp*, and are almost devoid of surrounding pericardial cells, as these cells in the thoracic segments give rise to the primary lymph gland. In contrast, in segments A1-A7 the most anterior two pairs of cardiomyocytes express *Seven-up* (*Svp*) while the next two pairs express *Tin* and *Ladybird* (*Lb*) and the posterior two cardiomyocytes only *Tin* (Perrin et al. 2004; Monier et al. 2007).

The A5-A7 segments constituting the heart have a wider lumen than the aorta, and in contrast to the posterior aorta the *Svp* expressing cardiomyocytes also express *Wg* and form the heart valves. *Wg* activation in the valve primordia requires both *Svp* and *Abd-A* function (Lo et al. 2002). The heart, as well as the posterior aorta, are surrounded by pericardial cells (Fig. 12.5). This antero-posterior regional subdivision is controlled by the *Hox* genes, which are expressed differentially along the dorsal vessel's antero-posterior axis (Perrin et al. 2004; Ryan et al. 2005; Lovato et al. 2002). *Lab*, *Dfd* and *Scr* are not expressed in the dorsal vessel (Lo et al. 2002) and there is no *Hox* gene expression in the anterior aorta that, surprisingly, is the only section with high levels of nuclear *Hth*. *Antp* is expressed in the posterior part of T3 and first pair of cardiomyocytes in A1, while *Ubx* is expressed in A1-A4. Finally, most of the heart expresses *Abd-A* although the two most posterior pairs of heart cardiomyocytes express *Abd-B* (Fig. 12.5).

Antp is required to activate *svp* expression in the A1 cardiomyocytes and, contrary to what happens in other tissues, *Antp* is not derepressed posteriorly in the dorsal vessel of *Ubx abd-A* double mutants. In *Ubx abd-A* double mutants the dorsal vessel adopts anterior aorta characteristics, with posterior cardiomyocytes expressing *Hth* ectopically and losing *svp*. The activation of heart specific markers, like *wingless* and *ndae1*, requires *Abd-A* but is independent of *Ubx*. In *abd-A* mutants the heart develops as a posterior aorta. Moreover, ectopic expression of *Abd-A* in the mesoderm induces the whole dorsal vessel to develop heart characteristics (Perrin et al. 2004; Lo et al. 2002; Ryan et al. 2005; Lovato et al. 2002; Ponzielli et al. 2002).

Ectopic expression of *Antp*, *Ubx* or *Abd-A* transforms the anterior aorta cardiomyocytes into posterior aorta/heart character. Surprisingly, ectopic *Ubx* can activate *wg* expression, a heart marker, in the posterior aorta although endogenous *Ubx* cannot. The reason why *Ubx*, that normally does not confer heart characteristics, can do so upon ectopic expression is unclear but it may be due to the much higher levels of *Ubx* expressed ectopically being able to compensate a lower binding affinity for some heart targets. Ectopic *Ubx* slightly down-regulates *ndae1* in the heart, suggesting it may be a negative regulator. Early ectopic *Abd-B* expression inhibits cardiogenesis and it is not known what its function in the posterior heart cells might be (Lo et al. 2002).

During metamorphosis the heart is remodeled, with the larval aorta cells becoming the adult contractile heart and the larval heart almost disappearing except for the A5 cells that become an adult heart pacemaker. This transformation is accompanied by a thorough modification of the Hox pattern of expression (Monier et al. 2005).

12.4.9 Lymph Gland Organogenesis

In *Drosophila*, the haemolymph is formed in temporal waves. The first one occurs during embryogenesis when the blood cells are specified from the cephalic mesoderm. A second wave takes place at larval stages from a specialized mesodermal organ: the lymph gland. In normal physiological conditions, the lymph gland gives rise to crystal cells and plasmatocytes, which are released at the onset of metamorphosis. In cases where the larva becomes infested with parasitic wasps, the lymph gland produces instead lamellocytes, a specialized cell that encapsulates and eliminates the wasp's egg. The lymph gland is closely apposed to the anterior aorta, immediately behind the ring gland (Fig. 12.5). The lymph gland primordium is formed from the dorsal thoracic mesoderm primordia that also give rise to the anterior aorta (Fig. 12.3b). The lymph gland is specified in the thorax at early st11 and can be detected as independent primordia expressing *odd skipped* (*odd*) and *collier* (*col*) (Mandal et al. 2007; Crozatier et al. 2004). These primordia form at homologous positions to those that in more posterior segments give rise to the pericardial cells that surround the posterior aorta and heart. There is evidence suggesting that the *Ubx* gene restricts the formation of primary lymph glands in the abdomen, allowing the formation of pericardial cells around the dorsal vessel (Mastick et al. 1995; Rodriguez et al. 1996). Ectopic expression of *Ubx* or *Abd-A* results in the disappearance of the lymph gland and the development of additional pericardial cells surrounding the aorta, suggesting that the lymph gland and the pericardial cells develop from homologous cells. The lymph gland primordia fuse at st13 and remain adjoining the anterior aorta primordium.

In the late third larval stage, three regions can be distinguished in the lymph gland: the cortex, the medulla and the posterior signaling center. The cortex is the more external region of the lymph gland where the differentiated blood cells localize. Surrounded by the cortex is the medulla that is formed by undifferentiated blood cell progenitors. The posterior signaling center (PSC) is formed by a small group of cells that secrete a large number of signaling molecules necessary to regulate medulla and cortex cell maturation (Morin-Poulard et al. 2014). The *Antp* gene is expressed in the T3 lymph gland primordium and can be used to specifically label the PSC during development. *Antp* is required in the PSC to maintain the expression of *col*. In contrast to the rest of the lymph gland, the PSC has low levels of proliferation during embryogenesis due to Dpp signaling down-regulating cMyc expression (Pennetier et al. 2012).

12.4.10 Somatic Muscle Organogenesis

Each *Drosophila* larval segment has about thirty multinucleated somatic muscles on each side. All muscles can be identified by their position, orientation and contact site to the ectodermal exoskeleton in a pattern that varies in different segments. Hox genes are transcribed in the mesoderm with their expression shifted posteriorly by one metamere with respect to their expression in the ectoderm. Several experiments prove that Hox genes control the segment muscle pattern along the antero-posterior axis of the larva (Hooper 1986).

Every somatic muscle arises from a single founder cell that expresses a unique set of transcription factors differentiating it from other founder cells. The founder cell fuses to 6–8 somatic Fusion Competent Myoblasts (FCM) to form the multinucleated muscle. After fusion, the FCM nuclei recruited to the muscle start expressing the same set of transcription factors that were active in the founder cell. Thus, the distinguishing characteristics of each somatic muscle are acquired at the early specification stage when the founder cell becomes specified from the somatic mesodermal cells.

To understand how particular somatic muscles develop, researchers have concentrated on muscles that can be unequivocally identified by either their position or the expression of specific markers. The first analysis of Hox requirement for embryonic somatic muscle development took advantage of the differential segmental expression of the *nautilus* (*nau*) gene, the ortholog of mammalian *MyoD*, in st14 embryos (Michelson 1994). In *Ubx* mutants the pattern normally observed on A1–A2 muscles was transformed to that seen in the thoracic segments and the same was true for A1–A7 in *Ubx abd-A* double mutants. The A8 segment is free of *Nau* expression at this stage but in *Abd-B* mutants A8 develops a *Nau* muscle pattern similar to that of more anterior abdominal segments. It was also observed that ectopic *Ubx* or *abd-A* expression exclusively in the mesoderm was sufficient to make the thoracic segments develop a *nau* pattern of expression similar to that observed in the abdominal segments. Changes in *nau* expression correlated with the appearance of abdominal muscles on thoracic segments that, in some cases, were able to attach correctly to the epidermis and contract, even though the epidermis did not express ectopically the Hox gene. These experiments showed that *Ubx* and *abd-A* had similar functions on somatic muscle development, and that the antero-posterior patterning of larval muscles is specified cell autonomously in the mesoderm (Michelson 1994). Similar cell autonomous transformations have been reported for the thoracic adult muscle precursors using the expression of *Twist* in st14 embryos (Greig and Akam 1993).

Hox genes also regulate the expression of *apterous* (*ap*) and *collier* (*col*), two genes required to specify particular muscles. An *ap* enhancer driving expression in the precursors forming the Lateral Transverse 1–4 (LT1–4) muscles in segments T2–A7 and LT1 muscle in A8 was isolated (Capovilla et al. 2001). This enhancer is expressed at higher levels in segments T2–T3 than in the abdomen. In *Antp* mutants the levels of expression of this *ap* enhancer in T2–T3 are reduced and the LT1–4

muscles disappear in the thorax. In vitro, Antp binds five sites in the *ap* mesoderm enhancer. These sites were mutated to resemble a Bicoid protein DNA-binding site that is only weakly bound by Antp. Such mutation abolished the expression of the enhancer in normal embryos or in embryos expressing ectopically the wild type Antp protein in the mesoderm. Interestingly, ectopic activation of an Antp protein variant where an amino acid had been mutated so that its homeodomain would bind with high affinity to the Bicoid DNA-binding sites, recovered the expression of the *ap* mesodermal enhancer, demonstrating that Antp (and probably Ubx) binds directly this *ap* cis-regulatory element (Capovilla et al. 2001).

Another muscle requiring Hox function is the Dorsal Acute 3 (DA3) that is present from the T2 segment to the A7 segment but is missing from T1 (Enriquez et al. 2010). Initially, DA3 progenitors express both *nautilus* and *collier* (*col*) in T1 as well as in T2-A7, however, expression of *col* in T1 soon disappears and is only maintained in the T2-A7 progenitors. DA3 progenitors express either Antp (in T2-T3) or Ubx (in A1-A7). In *Antp* loss of function mutants, *col* expression soon disappears from the progenitor cell and no DA3 forms in T2-T3. In *Antp Ubx* double mutant embryos *col* expression is not maintained in T2-A2 and these segments do not develop a DA3 muscle. Interestingly, DA3 muscle size is different in the thorax of wild type embryos due to the progenitors recruiting six FCMs while the abdominal progenitors recruit eight. Ectopic expression of Antp in the mesoderm induces the formation of a DA3 muscle in T1 with 6 nuclei, while Ubx or Abd-A expression induces a DA3 in T1 with eight nuclei. These experiments indicate that the Hox genes are required in the mesoderm to maintain *col* expression in the DA3 progenitor and to decide the number of FCM recruited in each segment. Two cis-regulatory elements have been identified that recapitulate *col* expression on DA3 (Enriquez et al. 2010). An early enhancer is transiently active from st10-11 and is first active from labium to A9 in a metamerically repeated promuscular cluster of cells, becoming restricted later to the founder cell due to Notch regulation. This early enhancer is initially expressed like *col*, but its expression is not maintained after st11. A late enhancer is activated at st11 in the DA3 founder cells of T2-A7, but not in T1 or more anterior segments. As the DA3 progenitor recruits FCM, the enhancer becomes active in them as well, labeling at st16 all DA3 muscle fibers. Subdivision of the late enhancer shows it contains sites independently regulated by Antp and by Ubx/Abd-A. The subfragment regulated by Ubx/Abd-A contains a predicted Hox binding site that when mutated decreases the enhancer's expression in DA3 founder cells (Enriquez et al. 2010). In this case Hox genes seem to be necessary to maintain the expression of *col* in the founder cell, that will be later required for establishing a *col* auto-regulatory feed back loop necessary for DA3 formation.

The alary muscles are specialized dorsal abdominal skeletal muscles attached symmetrically to the dorsal vessel and to the body wall in A1-A7. These are long, multinucleate muscles giving rise to an incomplete diaphragm supporting the heart and aorta. The development of alary muscles requires *Ubx* and *abd-A* function (LaBeau et al. 2009). *Ubx* is expressed in the A1-3 alary muscles, and *abd-A* in the A4-7. Mutations for *Ubx* result in the disappearance of the anterior 2-3 pairs of alary muscles expressing *Ubx*, while double *Ubx abd-A* mutants lose all alary

muscles. Moreover, ectopic *Ubx* or *Abd-A* expression in the whole mesoderm results in the formation of three additional pairs of alary muscles in the thoracic region (LaBeau et al. 2009).

The observation that alary muscles are the only abdominal muscles co-expressing the *tailup* (*tup*) and *optomotor-blind-related-gene 1* (*org-1*) genes helped finding the homologous thoracic muscles, named Thoracic Alary Related Muscles (TARMs), that also co-express these markers (Boukhatmi et al. 2014). The founder cells of TARMs and alary muscles form in T1-A7. While the abdominal founders extend dorsally forming the alary muscles, the T3 founder disappears probably by apoptotic death and the T1 and T2 founders extend posteriorly forming muscles joining the T1 and T2 ectodermal exoskeleton with the midgut. It has been shown that the extra alary muscles formed after ectopic *Ubx* expression result from the transformation of the TARM muscles into alary muscles (Bataille et al. 2015).

All the examples described above are cases where the Hox function is required cell autonomously in the muscle cells they are patterning. Despite some controversies, there is evidence that for some adult muscles Hox gene function is also required non-cell autonomously. Analyzing the formation of a male specific muscle (now known as the muscle of Lawrence) using cell transplantation of *Mcp* host cells (*Mcp* causes ectopic *Abd-B* expression and the appearance of an additional male muscle in A4 due to a homeotic transformation) into wild type recipients, it was suggested that the formation of the male muscle depends on the genotype of the axon innervating the muscle and not on the muscle's genotype (Lawrence and Johnston 1986).

A combination of Hox direct and indirect requirement has been shown in the adult thorax musculature. It has been observed that the triple allelic combination *abx bx³ pbx* (mutations in *Ubx* enhancers) that produces a four-winged fly (Lewis 1978, 1998), only affects the ectodermal structures: while the halteres and the small stripe of cuticle in the metanotum are homeotically transformed to wings and mesonotum, the internal musculature does not have a similar homeotic transformation (Fernandes et al. 1994). To beat their wings, flies have a strong musculature under the mesonotum known as the Indirect Flight Muscles (IFMs). In wild type flies the T3 haltere-associated musculature expresses and requires *Antp* while the T2 does not. In the four-winged flies, IFMs are not present in the homeotically transformed T3 because, although the number of myoblasts is similar to that of T2, *Antp* expression does not change and the muscles do not develop as IFMs. The T3 transformed myoblasts express the *vg* and *ct* pattern normally seen in T2, suggesting this is controlled non-cell autonomously by the ectodermal cells. If the triple *abx bx³ pbx* mutant is combined with an *Antp* hypomorphic mutation, flies lose most *Antp* protein in the T3 segment that now activates muscle founder cell markers and specific template derived mechanisms required to form IFMs (Dutta et al. 2010). These experiments suggest IFM development requires autonomous and non-autonomous Hox function. Altered expression of *Ubx* in the neurons innervating the muscles causes strong defects on IFM development, indicating that part of the non-cell autonomous effect of Hox genes may be mediated by the axons innervating the muscles (Dutta et al. 2010).

12.4.11 Gut Organogenesis

The *Drosophila* gut is subdivided into foregut, midgut and hindgut, all of which are formed by an epithelial monolayer tube surrounded by two layers of visceral musculature. The foregut and the hindgut epithelia develop from ectodermal cells, while the midgut epithelium is endodermal. The only Hox gene expressed in the endoderm is *labial*, that specifies a particular cell type, the copper cells (Hoppler and Bienz 1994). In contrast, *Scr*, *Antp*, *Ubx*, *abd-A* and *Abd-B* are expressed in the gut's visceral mesoderm, where they are required to form the gastric caeca, the three midgut constrictions and to control the hindgut's left right asymmetry (Reuter and Scott 1990; Bienz and Tremml 1988; Tremml and Bienz 1989; Coutelis et al. 2013; Bienz 1994).

The mesoderm surrounding the gut is formed from several sources: the inner circular musculature is derived from segmental trunk mesoderm, the external longitudinal musculature is formed from the caudal mesoderm and the hindgut and foregut mesoderm are specified near the anterior and posterior gut invagination sites. The trunk visceral mesoderm arises from dorsal mesodermal cells (Fig. 12.3) receiving high Dpp signal. As described above, dorsal mesoderm cells receiving Dpp and Wg signals become the dorsal vessel precursors, while the neighboring dorsal cells not receiving Wg become visceral mesoderm activating the *bagpipe* (*bap*), *biniou* (*bin*) and *org-1* transcription factors (Zaffran et al. 2001; Schaub and Frasch 2013). Bin and Bap are necessary to maintain the expression of visceral mesoderm genes, and when mutant the visceral precursors become integrated into the somatic musculature. The activation of *org-1* on the one hand and of *bap* and *bin* on the other is independent of each other and depends on *tin*. Although mutants for *bap* and *bin* have a strong effect on visceral mesoderm development, they do not affect the early activation of *Ubx* in this tissue (Zaffran et al. 2001). In contrast, *org-1* mutants lack *Scr* and *Ubx* although they do not affect *Antp* or *abd-A* activation. *Org-1* becomes restricted to visceral founder cells at st11, and at that stage *Antp*, *Ubx*, and *abd-A* are only expressed in the visceral mesoderm founder cells (Schaub and Frasch 2013). Ectopic expression of *org-1* in the whole trunk visceral mesoderm extends the expression of *Ubx* from founder cells only to the fusion competent cells as well (Schaub and Frasch 2013).

Hox genes are required in the visceral mesoderm for the normal development of the midgut. *Scr* is expressed from st13 in the anterior midgut mesoderm, where it is required for the formation of the gastric caeca. Surprisingly, *Scr* is not expressed in the mesoderm adjacent to the caeca but posterior to it (Reuter and Scott 1990). *Scr* expression in cells immediately surrounding the caeca is repressed by Dpp signalling. In embryos lacking *dpp* in the midgut visceral mesoderm *Scr* is ectopically expressed in the caeca mesoderm primordium and the caeca do not develop (Panganiban et al. 1990).

Antp is activated at st13 in the visceral mesoderm in the region that later forms the most anterior midgut constriction. In *Antp* mutant embryos this anterior constriction is missing (Reuter and Scott 1990). Ultrastructural analysis shows the

mesoderm cells accumulate microtubules in the cells that form the tip of the constriction. The orientation of the microtubules suggests they may form a drawstring helping to transmit the forces generating the constriction. This microtubule arrangement is also observed in the second and third midgut constrictions, regulated by *Ubx* and *abd-A* (Reuter and Scott 1990). Antp function is required to activate *teashirt* (*tsh*) expression in the anterior midgut constriction. This activation is probably indirect, mediated by a diffusible molecule, as it is controlled at a distance from the *Antp* expressing cells (Mathies et al. 1994).

Ubx and *Abd-A* are required for the formation of the second midgut constriction through the direct activation of their respective targets *dpp* and *wg* (Immerglück et al. 1990). In PS7 *Ubx* and its cofactor *Exd*, activate *dpp* expression by directly binding to a visceral mesoderm enhancer (Capovilla et al. 1994; Rauskolb and Wieschaus 1994). Activation of this enhancer also requires *Bin* binding, with *Bin* providing the tissue specificity and *Ubx* the antero-posterior positional specificity (Zaffran et al. 2001). *Abd-A* is expressed from PS8 to PS12, where it represses the *dpp* midgut enhancer and activates a *wg* enhancer in PS8 (Manak et al. 1995; Grienemberger et al. 2003). Besides *Ubx* input, maintenance of the PS7 *dpp* visceral mesoderm expression requires *Wg* signalling from PS8 (Yang et al. 2000). Similarly, maintenance of *wg* PS8 visceral mesoderm expression requires *Dpp* signalling from PS7 (Grienemberger et al. 2003). In turn, the activation of *wg* and *dpp* results in the expression of *tsh* in the visceral mesoderm around the second constriction. In *tsh* mutants the second constriction disappears, suggesting *tsh* is an indirect target of *Ubx* and *Abd-A* (Mathies et al. 1994). *Wg* signalling is also required for the maintenance of *Ubx* expression in PS7 (Thüringer and Bienz 1993), thus the formation of the second constriction requires the *Ubx* and *Abd-A* proteins and their targets that feed back to the Hox genes generating a morphogenetic gene network.

Abd-A is also required to form the third midgut constriction that separates the third and fourth gut chambers. The visceral mesoderm of the third gut chamber is entirely labeled by the expression of the *pointed* (*pnt*) gene and the fourth chamber by the expression of *odd-paired* (*opa*). Although expressed in non-overlapping domains, both *pnt* and *opa* are activated by *Abd-A*. This non-overlapping activation is achieved because *pnt* expression in the third chamber requires *Wg* signaling from PS8 besides *Abd-A*. *pnt* mutant embryos have a smaller third chamber but midgut patterning is correct. The expression of *opa* is excluded from the third chamber by repression mediated by the *Dpp* pathway, being PS7 the source of *Dpp*. Thus, *Abd-A* interaction with *Wg* and *Dpp* signaling results in the non-overlapping spatial expression of *pnt* and *opa* in the midgut (Cimbora and Sakonju 1995; Bilder et al. 1998).

The wild type hindgut is asymmetrically looped towards the right, and this requires *Abd-B*. In *Abd-B* mutant embryos the gut appears straightened. Left-right asymmetry in the gut (and the genital plate, see below) is controlled by the Myosin ID (*MyoID*) protein. ChIP analysis shows that *Abd-B* directly binds to the *myoID* cis-regulatory regions, suggesting *myoID* is a direct target. This is reinforced

by the observation that MyoID expression rescues the hindgut looping defects of *Abd-B* mutants, indicating that Abd-B is regulating the hindgut's orientation through MyoID (Coutelis et al. 2013).

12.4.12 Nervous System Organogenesis

All Hox genes are expressed in the nervous system where they control various aspects of the nervous system specification. We will not discuss this in detail as a description of Hox requirement in the CNS can be found in this volume (see Chap. 3).

12.5 Hox Genes and the Organogenesis of the Adult Appendages

Contrary to what happens in the embryo and we have described so far, organogenesis of the *Drosophila* adult-specific ectodermal derivatives requires an extensive time of cell proliferation, a more elaborated set of genetic inputs and mechanisms that coordinate proliferation with pattern formation. Thus, modulation of organogenesis by homeotic genes in the adult structures relies, in general, on complex genetic interactions that evolve during the larval period. Most of the adult external structures derive from imaginal discs, which grow actively during the larval period when much of pattern formation occurs, whereas differentiation takes place in the pupa.

The first clues on the role played by Hox genes during organ formation stemmed from the observation of homeotic transformations. However, some of the initial interpretations were misleading. For instance, the spectacular transformation of antenna to leg in the first *Antp* mutations isolated was wrongly interpreted as *Antp* being required to form the antenna. This phenotype was later shown to be due to the ectopic expression of *Antp* in the eye-antennal disc (Schneuwly et al. 1987a, b; Frischer et al. 1986). In fact, antennae, like wings, eyes or analia do not require any Hox gene for their development. Hox gene activity can be required to determine organ formation, as it happens in several examples in the embryo; it can modify the organ once it has been specified by modulating the extensive set of positional cues required to control cell behaviors; or it may specify particular cell types in the organ. Most homeotic transformations are due to changes in gene activity that modify one structure into a homologous one with common patterning mechanisms (wings and halteres, proboscis and leg, etc). In some instances, however, Hox mutations do not transform into any recognizable structure. For example, the absence of *Dfd* or *lab* mostly results in developmental abnormalities or in the lack of certain structures, like maxillary palps and other parts of the head (Regulski et al.

1987; Merrill et al. 1987, 1989). Similarly, some *Abd-B* mutant clones show abnormal development of the genitalia without a clear transformation to other structures (Estrada and Sánchez-Herrero 2001). This shows that Hox genes can contribute to organogenesis in ways that do not require modifying the basic positional information repeated in homologous organs. In what follows we describe Hox function in imaginal disc development.

12.5.1 *Halteres*

The halteres are club-shaped dorsal appendages formed in the third thoracic segment (T3) of Diptera that are used to stabilize flight. Halteres are homologous to wings, as shown by the first homeotic mutation isolated, which caused a transformation of T3 into T2 (second thoracic segment). This included the development of wings instead of halteres and of mesonotum, the T2 dorsal central region that makes up most of the thorax, instead of the metanotum, the slender piece of bare cuticle connecting the halteres in T3. Due to this latter effect, the mutant was named *bithorax* (Bridges and Morgan 1923).

Ubx input is not required to form the haltere imaginal disc, but only to modify its development, that in the absence of Ubx would give rise to its homologous structure, the wing. The identification of the genetic cascades regulated by *Ubx* provides a basis to ascertain how the haltere is made. *Ubx* modifies the Hedgehog, Decapentaplegic, Wingless, and Epidermal growth factor receptor pathways in an independent way, but in a temporally coordinated manner, to regulate gene expression and so determine size, shape and differentiation of the haltere (Galant et al. 2002; Shashidhara et al. 1999; Weatherbee et al. 1998; Prasad et al. 2003; Hersh and Carroll 2005; Walsh and Carroll 2007; Mohit et al. 2006; Crickmore and Mann 2006, 2007; de Navas et al. 2006; Makhijani et al. 2007; Pallavi et al. 2006). Genomic approaches have also identified a substantial number of genes bound or regulated by Ubx in the haltere disc: microarray analyses uncovered many Ubx targets in the haltere disc (Pavlopoulos and Akam 2011; Hersh and Carroll 2005; Mohit et al. 2006; Hersh et al. 2007). In one of these reports (Pavlopoulos and Akam 2011) attention was paid to isolate the putative primary targets and to identify downstream genes regulated at different time points at the late larval stage and early pupa. ChIP studies identified many genes bound by Ubx in the haltere disc, although it is unknown how many of them are actually regulated in vivo (Choo et al. 2011; Slattery et al. 2011; Agrawal et al. 2011). These experiments show that different genes are regulated at different developmental times and that downstream genes are not only other transcription factors but also genes directly involved in cellular processes (“realizator” genes). This suggests a complex architecture of gene regulation to make the haltere.

The regulation of signaling pathways in the haltere disc occurs mostly during the larval period, when patterning differences with respect to the wing disc are established. Halteres are smaller than wings due to three reasons: first, Ubx activity in the

embryo makes the haltere disc primordium about half the size of the wing disc at the end of the embryonic development (Morata and García-Bellido 1976; Madhavan and Schneidermann 1977). Second, regulation by *Ubx* of *dpp* expression and activity by controlling the levels of the Dpp receptor encoded by *thick veins*, of the glypican *dally* and of the co-repressor *master of thick veins* during the larval period reduces haltere growth (Crickmore and Mann 2006, 2007; de Navas et al. 2006; Makhijani et al. 2007; Funakoshi et al. 2001). Finally, the increase in cell area of the wing is suppressed by *Ubx* in the haltere (Roch and Akam 2000). Differentiation of the haltere takes place in the pupa. In this period *Ubx* induces several changes: haltere cells become smaller than wing cells, several hairs differentiate in each haltere cell compared to only one in wing cells, haltere cells secrete a thicker cuticle than wing cells, and the haltere differentiates campaniform sensilla and represses the formation of veins, bristles and wing sensilla (Pavlopoulos and Akam 2011; Roch and Akam 2000). Many genes related to these processes have been shown to be differently regulated in the wing and haltere discs during pupa (Pavlopoulos and Akam 2011).

It is interesting to note that in the distal part of the haltere, the capitellum, the Hox cofactors Homothorax (Hth) and Extradenticle (Exd) are either not expressed (Hth) or located in the cytoplasm (Exd). Accordingly, Exd and Hth are not required to make halteres (Agrawal et al. 2011; Aspland and White 1997; Azpiazu and Morata 1998) and *Ubx* must regulate its targets without the aid of these cofactors. An example of this was described for the regulation of *sal*. *sal* is expressed in the presumptive notum and in the pouch of the wing disc, and this latter expression is required for the development of the region between veins II and V (de Celis et al. 1996). *sal* expression is also observed in the presumptive metanotum but it is repressed by *Ubx* in the haltere pouch (Weatherbee et al. 1998). Direct repression of *sal* by *Ubx* is achieved through individual *Ubx* monomer binding sites (Galant et al. 2002). Two Smad proteins in the Decapentaplegic signaling pathway, Mad and Medea, act as collaborators of *Ubx* in this repression, as *Ubx*-binding sites need to be close to low-affinity binding sites for these two proteins to effect repression (Walsh and Carroll 2007). Due to the lack of Hth and nuclear Exd in the haltere pouch, it is likely that *Ubx* directly regulates other targets required to make haltere, binding as a monomer or with the help of different collaborators. *Ubx* also binds *knot* (also known as *collier*) directly in the haltere pouch as a monomer. *knot*, which in the wing pouch is needed for the development of the region between veins III and IV, is repressed by *Ubx* in the haltere disc (Hersh and Carroll 2005).

12.5.2 Legs

The *Drosophila* legs are similar to each other although prothoracic (T1), mesothoracic (T2) and metathoracic (T3) legs possess distinctive features. Leg discs are formed in the embryo and require the expression of *Distal-less* (*Dll*), a gene coding for a homeodomain protein marking the position where leg discs develop

(Cohen 1990), and of the *buttonhead* and *Sp1* genes, both encoding zinc finger transcription factors required for the maintenance of *Dll* expression (Estella et al. 2003; Estella and Mann 2010). During larval development the leg discs are subdivided into proximal, medial and distal regions by the expression of different genes along the proximo-distal axis: *hth* in the proximal region, *dachsund* (*dac*) in the intermediate one and *Dll* in the distal region, although there are also domains defined by the overlap of two of these genes. The regulation of *Dll* enhancers is particularly relevant for the distal and proximal leg subdivision (Estella et al. 2008; McKay et al. 2009). Further genetic subdivision of the distal leg (the tarsus) and formation of joints between segments complete leg formation [reviewed in (Estella et al. 2012; Kojima 2004)]. While leg subdivision is common to all legs, the distinct morphology of prothoracic, mesothoracic and metathoracic legs depends on Hox gene activity.

Antp is required for the development of the proximal T2 leg and in its absence part of the leg is transformed to antenna (Struhl 1981, 1982; Casares and Mann 1998). To form a leg, *Antp* has to repress genes normally transcribed in the antennal primordium, like *sal* (Wagner-Bernholz et al. 1991), *hth* (Casares and Mann 1998), *spineless* (*ss*) (Duncan et al. 1998) or *distal-antenna* (*dan*) and *distal-antennarelated* (*danr*) (Emerald and Cohen 2004; Emerald et al. 2003). *Antp* directly represses *ss* (and possibly other genes required for antennal development) (Duncan et al. 2010) by competing out *Dll* binding that in combination with *Hth* and *Exd* would result in antennal development (Duncan et al. 2010; Dong et al. 2000). It is interesting to note that *Antp* is required to suppress the expression of antennal genes and development of antenna only in a proximal domain and that outside it, *Antp* mutant clones are normal (Struhl 1981, 1982; Duncan et al. 2010). As to the distal part of the legs, the tarsi, it has been proposed that *Scr*, expressed in the mesodermal cells of the three leg discs, induces the formation of a tarsus (Percival-Smith et al. 1997).

T1 legs differ from T2 due to *Scr* activity and T3 from T2 due to *Ubx* (Lewis 1963; Struhl 1982; Lewis et al. 1980) (an early role of *Ubx* in the posterior T2 segment is not considered here). The morphological similarity between all legs suggests there are not many genes differentially regulated by *Ubx* or *Scr* in leg imaginal discs. In fact, comparative genomic analyses of the three leg imaginal discs found few genes to be differentially expressed (Barmina et al. 2005; Klebes et al. 2002).

A significant difference between legs is their bristle pattern. During the formation of the T3 leg, *Ubx* represses or activates genes required for bristle formation at different points of the bristle gene network and at different times in development (Rozowski and Akam 2002; Shroff et al. 2007). For example, *Ubx* represses *Delta* expression in the basitarsus, causing down-regulation of the Notch signaling pathway, which alleviates the repression of the *achaete* gene and allows bristle formation (Shroff et al. 2007). The regulation of *Delta* expression by *Scr* or *Ubx*, therefore, determines a particular set of bristles (T-rows) of the distal T1 and T3 leg, respectively. In addition, the formation of the “sex comb” (a male specific bristle row formed in T1) depends both on *Scr* and the sex determination gene pathway.

An increase in the expression of *Scr* in the basitarsus of this leg causes up-regulation of *doublesex*, the gene at the end of the somatic sex-determination cascade that in males gives rise to the Doublesex Male (DsxM) protein. This protein activates *Scr*, which in turn activates *dsx*, so that the high expression of both proteins determines the development of the sex comb (Barmina and Kopp 2007; Tanaka et al. 2011). As in the haltere disc, the distal part of the leg disc lacks *hth* expression and Exd is cytoplasmic, implying that Hox proteins regulate their targets in the absence of these cofactors (Aspland and White 1997; Casares and Mann 1998; González-Crespo and Morata 1995; Rauskolb et al. 1995).

12.5.3 Genitalia

The adult genitalia and analia originate from the genital disc, which is formed by cells from three segments: A8, A9 and A10. Contrary to most other imaginal discs that have symmetrical left and right discs, there is a single and sexually dimorphic genital disc, with the A8 derivatives bigger than the A9 ones in females and the opposite in males (Fig. 12.6a). By contrast, the A10 derivatives that form the analia are of the same size in males and females (not shown in Fig. 12.6 discs due to their dorsal location). The female A8 gives rise to all of the female genitalia except the parovaria and part of the uterus, which are made by A9 cells. In males, A9 gives rise to the male genitalia and A8 cells only contribute to a small piece of cuticle between genitalia and abdomen (Keisman et al. 2001; Nöthiger et al. 1977). The *abd-A* gene is expressed in A8 of the female genital disc and *Abd-B* in A8 and A9 of both discs (Freeland and Kuhn 1996; Casares et al. 1997).

As mentioned before, the *Abd-B* gene gives rise to two different proteins, Abd-Bm and Abd-Br, differing from the inclusion of a 223 aminoacid N-terminal domain in Abd-Bm that is absent in Abd-Br (Celniker et al. 1989; Zavortink and Sakonju 1989). In male or female genital discs, Abd-Bm is expressed in A8 and Abd-Br in A9 (Casares et al. 1997; Foronda et al. 2006). Abd-A is expressed in part of the female A8 and required for the development of the female internal genitalia, Abd-Bm for the formation of external and internal female genitalia and Abd-Br for male genitalia (Foronda et al. 2006). The absence of both Abd-B isoforms transforms the male or female genitalia (mostly the internal one) into distal leg or antenna, the latter probably due to the concomitant expression of *hth*, but only if the *Abd-B* clones are induced in a certain region of the genital disc (Estrada and Sánchez-Herrero 2001). This transformation reveals a common background information between genitalia, leg and antenna primordia, and in fact the expression of *engrailed*, *wingless* and *decapentaplegic* in the genital disc resembles that in the leg or antennal discs [reviewed in (Estrada et al. 2003)]. As in the leg disc, *wg* and *dpp* are required for the expression of *Dll* and *dac*, but here in combination with the sexual determination pathway and *Abd-B*; however *Dll* and *dac* are barely needed for genitalia development, particularly in females (Keisman and Baker 2001; Gorfinkiel et al. 1999).

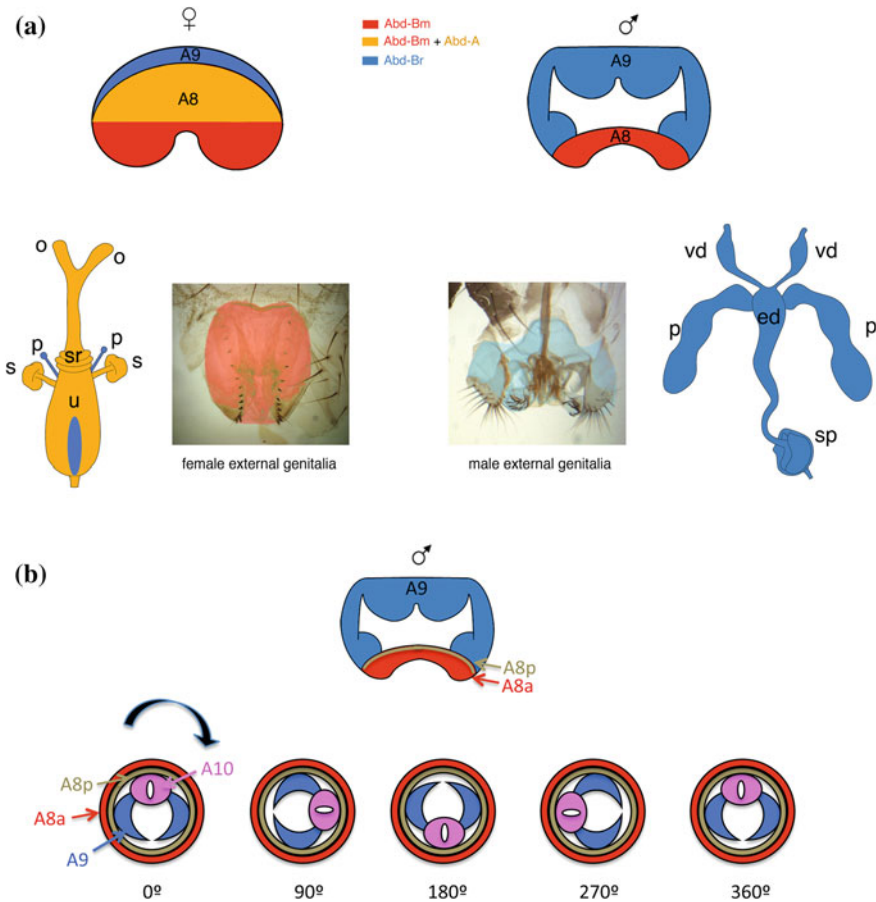


Fig. 12.6 Male and female genital development. **a** Scheme indicating the spatial Hox expression in the female and male genital discs and in their internal and external derivatives. Regions in the A8 and A9 segments coexpressing Abd-Bm and Abd-A are highlighted *orange*, expressing only Abd-Bm in *red*, and expressing only Abd-Br in *blue*. The scheme presents the ventral side of the discs, not showing the dorsally located A10 (Keisman et al. 2001; Freeland and Kuhn 1996; Casares et al. 1997; Foronda et al. 2006). **b** Dextral rotation of the male genitalia and analia (as viewed from the outside). A8a (*red*) and A8p (*brown*), A9 derivatives (*blue*), analia (*pink*). In the male genital disc shown above, A8a and A8p segments express Myosin ID. A summary of the 360° rotation is shown below. The A8p + analia module starts rotation before A8a but this has not been indicated to simplify the figure [modified from Suzanne et al. (2010)]. *ed* ejaculatory duct; *o* oviduct; *p* paragonia; *s* spermathecae; *sp* sperm pump; *sr* seminal receptacle; *u* uterus; *vd* vas deferens

The small size of the female A9 and the male A8 has been ascribed to the absence of activation of different signaling pathways. *dpp* expression is absent in the female A9 but in mutant clones for the gene *transformer*, where the DsxM protein is produced instead of DsxF, *dpp* is activated and there is overgrowth of the segment. Similarly, if DsxF expression is eliminated in the male A8 (and DsxM is

active), the Wingless pathway becomes active and the segment increases its size (Sánchez et al. 2001). As described in the preceding paragraph, the *Abd-Bm* transcript is expressed in A8 of male and female genital discs, whereas *Abd-Br* RNAs are observed in A9 of both types of discs (Casares et al. 1997; Foronda et al. 2006). Therefore, it was proposed that in the female A9, the combination of *Abd-Br* and *DsxF* represses *dpp* (and, as a result, the segment is small) whereas in the male A8 the combination of *Abd-Bm* and *DsxM* represses *Wg* activity resulting in reduced growth (Sánchez et al. 2001).

Apart from *Dll* and *dac*, the *homothorax*, *eyegone*, *twin-of-eyegone*, *caupolican*, *apterous*, *optomotor-blind*, *branchless*, *lozenge*, *Drop* and *AP-2* genes are required for genitalia formation and are expressed differentially in male and female genital discs (Estrada and Sánchez-Herrero 2001; Ahmad and Baker 2002; Chatterjee et al. 2011). Since these genes are also expressed, within male or female discs, in A8 or A9, it is likely that their expression is also controlled by the particular expression of *Abd-A*, *Abd-Bm* and *Abd-Br*. Thus, the Hox and sexual determination genes are likely to construct the genitalia through these intermediates. Interestingly, the *breathless*-expressing cells, only present in A9 of the mature male disc, are recruited from the mesoderm undergoing a mesenchyme to epithelial transition, and are needed for the development of the paragonia and vas deferens of the male internal genitalia (Ahmad and Baker 2002).

A characteristic phenotype of *Abd-B* heterozygous males is a defect in the orientation of the genitalia. During pupal stages the *Drosophila* male genital plate rotates 360° dextrally (clockwise, as viewed from the posterior end, Fig. 12.6b) and this entails the internal rotation of the spermiduct around the hindgut (Adam et al. 2003; Géminard et al. 2014). The velocity of rotation varies during the whole process, showing an acceleration after the initial step (Kuranaga et al. 2011). This circumrotation is the result of two independent rotation steps, affecting two different groups of cells of the male genital disc. An external ring, deriving from the anterior part of A8 (A8a), rotates 180°, while a set of structures encircled by the A8 ring that comprises A8p, and the primordia of the male genitalia (A9) and analia (A10), make a further 180° rotation. In this way, a complete 360° turn is observed for the terminalia (genitalia plus analia) (Suzanne et al. 2010). These modules have been described somewhat differently in another report, with the A8p domain subdivided into two domains, A8pa and A8pp, the latter rotating with the genitalia and analia (Kuranaga et al. 2011). The rotation of the second module (A8p, A9 and A10) occurs at about 26 h after puparium formation and the other follows closely (Kuranaga et al. 2011; Suzanne et al. 2010).

This dextral rotation, as well as other left-right asymmetries in *Drosophila*, depends on the myosin protein encoded by the *myosinID* (*myoID*) gene (Speder et al. 2006; Hozumi et al. 2006), which acts as an actin-based motor protein. *myoID* is expressed in two chevron-like bands in the A8 of the male genital disc, one in the anterior and the other in the posterior compartment, indicating this small segment is the region organizing the entire terminalia rotation (Speder et al. 2006). Absence of the *MyoID* protein in each band affects the rotation of one of the two modules described above, making them to rotate 180° in the opposite direction (sinistrally).

As a result, if MyoID is absent just in one band no apparent rotation of the genitalia is observed, due to the opposing effects of the rotation in the two modules. In *myoID* mutants, where both modules are affected, there is an inverse (sinistral) 360° rotation of the terminalia (Suzanne et al. 2010; Speder et al. 2006).

Other proteins required for rotation in the A8 of the male genital disc are the *Drosophila* β -catenin homolog, Armadillo, to which MyoID binds, α -Catenin and E-cadherin. This suggests a crucial role of adherens junctions in transmitting the signal for rotation (Petzoldt et al. 2012). Changes in the activity of the Jun N-terminal Kinase (JNK) signaling pathway also result in rotation defects (Holland et al. 1997; Glise et al. 1995; Macías et al. 2004; Rousset et al. 2010). Finally, when cell death is prevented, male terminalia rotation is also affected (Kuranaga et al. 2011; Suzanne et al. 2010; Macías et al. 2004; Abbott and Lengyel 1991; Grether et al. 1995). Cell death is observed in peripheral cells of the two modules and, interestingly, only at the time when genital plate rotation takes place (Kuranaga et al. 2011; Suzanne et al. 2010). Apoptosis is needed to regulate the speed of rotation (Kuranaga et al. 2011) and may also reduce the connection between the modules, so that they can rotate independently (Suzanne et al. 2010) or reorganize the cytoskeleton of nearby cells to drive rotation (Kuranaga et al. 2011), but does not determine the direction of rotation (Suzanne et al. 2010).

As we have previously described, *Abd-B* is expressed in the male A8. In *Abd-B* mutants there is no *myoID* expression and no rotation of the genital plate. *Abd-B* also binds sequences in the *myoID* gene, suggesting the regulation is direct. Expressing *myoID* in an *Abd-B* mutant background restores the 360° dextral rotation, but in a double *Abd-B myoID* mutant there is no rotation, suggesting that *Abd-B* also controls a putative sinistral rotation pathway (Coutelis et al. 2013). This has led to the idea that *Abd-B* controls both dextral and sinistral rotations, the former through regulating the expression of MyoID and the latter through an unknown mechanism. That is, the Hox gene *Abd-B* not only determines part of the *Drosophila* body along the antero-posterior axis, but also regulates elements involved in determining left/right asymmetry (Coutelis et al. 2013).

12.5.4 Proboscis

The proboscis is an adult feeding organ derived from the labial imaginal discs. This organ can be transformed into distal antenna (arista) in *pb* hypomorph (weak loss of function) conditions or to distal T1 leg in *pb* null mutations (Kaufman 1978). In *Scr* hypomorphic mutations, structures with a loosely defined morphology, sometimes resembling maxillary palps, substitute for labial pals (Pattatucci et al. 1991) but in animals lacking both *pb* and *Scr* the proboscis is transformed to antenna (Percival-Smith et al. 1997). Therefore, both *pb* and *Scr* are needed for proboscis formation, although it has been argued that *Scr* specifies proboscis and *pb* is needed just to modify *Scr* activity (Percival-Smith et al. 2013). The *Drosophila* labial imaginal disc is organized similarly to other ventral discs (antennal, leg and genital

disc): expression of *hedgehog* in the posterior compartment induces *dpp* and *wg* in dorsal and ventral domains in the anterior compartment, although at lower levels than in the leg or antennal primordia, indicating *pb* inhibits *hh* signaling. *pb* represses *dac* cell-autonomously, perhaps modifying in this way cell differentiation, and counteracts *hh* signaling; this latter effect results in changes in *wg* and *dpp* expression, which entails non-autonomous modification of the global structure and size of the disc and the proboscis and contributes to cell specification (Joulia et al. 2005, 2006).

The combination of *hh*, *wg* and *dpp* gives rise to a proximo-distal organization that results in an expression of genes defining separate domains that differs slightly from that of other discs: *Dll* is present on a small area at the distal end of the disc, *dac* is absent and *hth* and *exd* are expressed also at low levels in the proximal side, close to the attachment of the disc to the larval epidermis. In *pb* or *Scr* single or double mutants or mutant clones, the patterns of expression of the proximal-distal genes are modified, resulting in expression levels and distribution (including derepression of *dac*) characteristic of maxillary, leg or antennal primordia, in accordance with the adult transformations observed. The expression of genes characteristic of antennal development, such as *sal* or *dan*, is also suppressed in the labial disc (Joulia et al. 2006; Abzhanov et al. 2001). These results indicate that organogenesis of the proboscis requires *pb* and *Scr* to reduce Hh pathway signaling and to down-regulate the expression of proximo-distal genes. These effects on gene expression are accompanied by a reduction in organ size, probably resulting from reduced cell proliferation, and a lack of joints, when compared to leg or antennal primordia (Joulia et al. 2006; Abzhanov et al. 2001).

12.5.5 Maxillary Palps

In the embryo, *Deformed* (*Dfd*) is required for the development of the maxillary and mandibular segments and *Dfd* mutants also affect other head structures (Regulski et al. 1987; Merrill et al. 1987). One of its embryonic functions is to make the groove that separates maxillary and mandibular segments, thus delimiting their shape, and does so by controlling the expression of the proapoptotic gene *reaper* (*rpr*) in the anterior part of the maxillary segment. *Dfd* binds to the *rpr* cis-regulatory region and induces *rpr* expression and subsequent cell death, which is required to maintain the boundary between mandibular and maxillary lobes (Lohmann et al. 2002). In this regulation *Dfd* collaborates with other eight factors that help to restrict *rpr* expression to only some cells of the *Dfd* domain (Stobe et al. 2009).

In the adult, *Dfd* is needed to make vibrissae (a set of hairs located ventral to the eye) and maxillary palps (Merrill et al. 1987). The presence of *pb*, however, is also required for correct maxillary palp development and it has been proposed that *pb* is responsible for this specific development (Percival-Smith et al. 1997). These appendages derive from a small region of the eye-antennal disc (see Chap. 4; Fig. 4.1 in this volume), including part of the peripodial membrane (Chadwick et al. 1990;

Chadwick and McGinnis 1987; Martinez-Arias et al. 1987). Within the maxillary field, *Dfd* is expressed more strongly in the columnar epithelium and at low levels in the cuboidal peripodial epithelium. Both regions are separated by a fold (the Maxillary-Peripodial epithelium boundary, Mx-PE), marked by the presence of a cable of Spaghetti-squash (*Sqh*) protein, the regulatory light chain of the non-muscle Myosin II encoded by the *sqh* gene (Karess et al. 1991). The formation of the cable depends on *Dfd*, since it is absent in *Dfd* null mutant clones or *Dfd* hypomorphic alleles (Tiberghien et al. 2015). Interestingly, in other imaginal discs, areas showing differences in expression of the Hox genes *Ubx* or *Abd-B* have also been shown to accumulate myosin II at the interphase, which may be sufficient to maintain antero-posterior and dorso-ventral compartment boundaries in the absence of the signals that normally establish them (Curt et al. 2013).

E-cadherin localizes apically in the maxillary field epithelium but accumulates basally at the beginning of fold formation in cells close to the fold. During this process, Actin and *Sqh* also build up basally concomitantly with E-cadherin; afterwards, cells undergo a basal constriction that precedes invagination and fold development (Tiberghien et al. 2015). Reduction of E-cadherin leads to absence of basal constriction and of the fold. Significantly, if *Dfd* expression is reduced, there is lower amount of basal, but not apical, E-cadherin; similarly, ectopic expression of *Dfd* makes cells segregate from their neighbors and accumulate more basal E-cadherin than in the adjacent wild type cells. However, only some cells in the maxillary field, those close to the Mx-PE boundary, accumulate E-cadherin basally, suggesting a more complex situation. Therefore, within the maxillary region of the eye-antennal disc, cells with different levels of *Dfd* expression induce accumulation of E-cadherin and a fold marked by a cable of Myosin II at the interphase, and these processes are required for the correct localization and development of maxillary palps (Tiberghien et al. 2015).

A similar role for Hox genes in segregating cell populations, and in this way contributing to organ formation, has been reported in the developing vertebrate hindbrain. Lineage boundaries in this part of the brain are observed between segmental units called rhombomeres (Lumsden and Keynes 1989; Jimenez-Guri et al. 2010; Fraser et al. 1990). These are characterized by the particular expression of different transcription factors, including Hox genes, and absence of Hox genes leads to loss of rhombomere structure [reviewed in Narita and Rijli (2009)]. It has recently been shown that differences in Hox4 expression within the hindbrain are necessary and sufficient to segregate cells and form a rhombomere boundary (Prin et al. 2014). Hox genes may establish these boundaries through the regulation of ephrins and ephrin ligands (Prin et al. 2014), which are expressed differentially in adjacent rhombomeres (Nieto et al. 1992; Becker et al. 1994; Bergemann et al. 1995; Flenniken et al. 1996; Xu et al. 1995, 1999; Mellitzer et al. 1999; Cooke et al. 2001). Ephrin signaling may regulate the formation of a myosin cable between adjacent rhombomeres to maintain the boundaries (Calzolari et al. 2014). Therefore, Hox proteins are able to maintain lineage boundaries in vertebrates and in *Drosophila* even if this function is normally overridden by other signaling mechanisms (Curt et al. 2013; Prin et al. 2014).

12.6 Hox Input into the Organogenetic Gene Network

Hox genes are responsible for inducing the formation or modulating the morphology of most organs. As described in this review, Hox genes act in different ways depending on the organ studied. Hox genes can in some cases induce organ formation (for example salivary glands, posterior spiracles) or repress it (suppression of leg development in the abdominal segments). When considering their temporal requirement, in some organs like the corpora allata, the prothoracic glands or the salivary glands of *Drosophila*, Hox input is only required for the early specification of the organ and later Hox expression is turned off. In contrast, in organs like the *Drosophila* dorsal vessel, there is no evidence that Hox genes are needed for the organ specification but they are required for the organ's antero-posterior functional regionalization. Similarly, in the specification of most adult structures Hox genes modify a basic pattern they do not determine. Finally, in other organs, like the posterior spiracles, Hox input is required for its early specification but also for the activation of genes controlling later morphogenetic processes.

While in most organs Hox requirement is cell autonomous, in the *Drosophila* oenocytes, some adult muscles and in the mammalian ribs, the Hox organogenetic function is non-autonomous, that is, not acting on the organ directly, but on neighboring cells that indirectly control the organogenesis.

If Hox function is analyzed from the downstream target point of view, a similar diversity can be found. In some cases Hox activity can be mediated by the regulation of very few targets (for example, during gonadogenesis Abd-A's main function is to prevent *serpent* expression and during oenocyte specification Abd-A main function is to compete out the Senseless repressor). Moreover, in these two organs the Hox gene plays a permissive and not an instructive role, which contrasts with other cases where the Hox input is used repeatedly to regulate different targets during organogenesis as is the case for the posterior spiracles, where Abd-B is required first to activate the genes needed for spiracle determination and later to activate genes controlling specific cell behaviors during organogenesis. The development of posterior spiracles by *Abd-B* stands out perhaps as the best-studied case to illustrate how complex the architecture of Hox-directed gene regulation can become during organogenesis. Far from being a simple top-down hierarchical regulation of downstream targets in a regulated temporal succession, it exemplifies the elaborate genetic control of patterning and cellular processes of organogenesis.

It is difficult to envisage how such complex gene networks may have evolved. One hypothesis based on the posterior spiracle development, is that when a morphogenetic gene is recruited to a gene network it destabilizes the cell homeostasis creating a selective pressure that leads to the recruitment of further genes to the same network to regain homeostasis (Sotillos et al. 2013). Interestingly, it has been observed that once a complex gene network has developed, it can be recruited to another region of the body to create a new structure. The development of the male posterior lobe in the *Drosophila* genitalia, though being a very different structure

from a posterior spiracle, has co-opted its genetic network, thus showing how an evolutionary novelty may use a pre-existing core genetic circuit to construct a new organ (Glassford et al. 2015).

Where does the heterogeneous Hox activity seen during organogenesis leave the classical view that Hox genes are regulating segment identity? Segment identity is an abstract concept coined during the heroic times of developmental biology research prior to the establishment of molecular biology techniques. At that time, the effects of a Hox mutation had to be inferred by the mutant phenotype observed in the larva or the adult, hours or even days after Hox function had occurred. As a result, Hox genes were seen to confer a homogeneous “identity” property affecting in a similar manner all cells in the segment and throughout development rather than affecting particular properties of specific cells at different times. This view has changed thanks to the molecular techniques leading to the variety of tools available today that allow studying with temporal precision and cellular resolution Hox function at the time when it is happening. So, can we now define what makes Hox proteins different from other transcription factors? May be the main characteristic of Hox genes in all animals is having a restricted antero-posterior expression pattern along the body axis that is very often maintained during development. As a result, any gene or gene network under the regulation of a Hox protein has a localized regional activity leading to the functional specialization of particular segments along the antero-posterior axis. May be it is this capacity to generate specialized structures in different metameres, which provide new adaptation possibilities to the animal, what has been the secret of Hox gene success.

References

- Abbott, M. K., & Lengyel, J. A. (1991). Embryonic head involution and rotation of male terminalia require the *Drosophila* locus head involution defective. *Genetics*, 129(3), 783–789.
- Aboobaker, A. A., & Blaxter, M. L. (2003). Hox gene loss during dynamic evolution of the nematode cluster. *Current Biology: CB*, 13(1), 37–40.
- Abrams, E. W., & Andrew, D. J. (2005). CrebA regulates secretory activity in the *Drosophila* salivary gland and epidermis. *Development*, 132(12), 2743–2758.
- Abrams, E. W., Mihoulides, W. K., & Andrew, D. J. (2006). Fork head and Sage maintain a uniform and patent salivary gland lumen through regulation of two downstream target genes, PH4alphaSG1 and PH4alphaSG2. *Development*, 133(18), 3517–3527.
- Abzhanov, A., Holtzman, S., & Kaufman, T. C. (2001). The *Drosophila* proboscis is specified by two Hox genes, proboscipedia and Sex combs reduced, via repression of leg and antennal appendage genes. *Development*, 128(14), 2803–2814.
- Adam, G., Perrimon, N., & Noselli, S. (2003). The retinoic-like juvenile hormone controls the looping of left-right asymmetric organs in *Drosophila*. *Development*, 130(11), 2397–2406.
- Agrawal, P., Habib, F., Yelagandula, R., & Shashidhara, L. S. (2011). Genome-level identification of targets of Hox protein Ultrabithorax in *Drosophila*: Novel mechanisms for target selection. *Scientific Reports*, 1, 205.
- Ahmad, S. M., & Baker, B. S. (2002). Sex-specific deployment of FGF signaling in *Drosophila* recruits mesodermal cells into the male genital imaginal disc. *Cell*, 109(5), 651–661.

- Andrew, D. J., Horner, M. A., Petitt, M. G., Smolik, S. M., & Scott, M. P. (1994). Setting limits on homeotic gene function: Restraint of Sex combs reduced activity by teashirt and other homeotic genes. *The EMBO Journal*, 13(5), 1132–1144.
- Appel, B., & Sakonju, S. (1993). Cell-type-specific mechanisms of transcriptional repression by the homeotic gene products UBX and ABD-A in *Drosophila* embryos. *The EMBO Journal*, 12(3), 1099–1109.
- Aspland, S. E., & White, R. A. (1997). Nucleocytoplasmic localisation of extradenticle protein is spatially regulated throughout development in *Drosophila*. *Development*, 124(3), 741–747.
- Azpiazu, N., & Morata, G. (1998). Functional and regulatory interactions between Hox and extradenticle genes. *Genes & Development*, 12(2), 261–273.
- Bach, E. A., et al. (2007). GFP reporters detect the activation of the *Drosophila* JAK/STAT pathway in vivo. *Gene Expression Patterns: GEP*, 7(3), 323–331.
- Banreti, A., Hudry, B., Sass, M., Saurin, A. J., & Graba, Y. (2014). Hox proteins mediate developmental and environmental control of autophagy. *Developmental Cell*, 28(1), 56–69.
- Barmina, O., Gonzalo, M., McIntyre, L. M., & Kopp, A. (2005). Sex- and segment-specific modulation of gene expression profiles in *Drosophila*. *Development Biology*, 288(2), 528–544.
- Barmina, O., & Kopp, A. (2007). Sex-specific expression of a HOX gene associated with rapid morphological evolution. *Development Biology*, 311(2), 277–286.
- Bataille, L., Frendo, J. L., & Vincent, A. (2015). Hox control of *Drosophila* larval anatomy; The alary and thoracic alary-related muscles. *Mechanisms of Development*, 138(Pt 2), 170–176.
- Becker, N., et al. (1994). Several receptor tyrosine kinase genes of the Eph family are segmentally expressed in the developing hindbrain. *Mechanisms of Development*, 47(1), 3–17.
- Bergemann, A. D., Cheng, H. J., Brambilla, R., Klein, R., & Flanagan, J. G. (1995). ELF-2, a new member of the Eph ligand family, is segmentally expressed in mouse embryos in the region of the hindbrain and newly forming somites. *Molecular and Cellular Biology*, 15(9), 4921–4929.
- Bienz, M. (1994). Homeotic genes and positional signalling in the *Drosophila* viscera. *Trends in Genetics*, 10, 22–26.
- Bienz, M., & Tremml, G. (1988). Domain of Ultrabithorax expression in *Drosophila* visceral mesoderm from autoregulation and exclusion. *Nature*, 333(6173), 576–578.
- Bilder, D., Graba, Y., & Scott, M. P. (1998). Wnt and TGFbeta signals subdivide the AbdA Hox domain during *Drosophila* mesoderm patterning. *Development*, 125(9), 1781–1790.
- Boukhatmi, H., et al. (2014). An Org-1-Tup transcriptional cascade reveals different types of alary muscles connecting internal organs in *Drosophila*. *Development*, 141(19), 3761–3771.
- Boulet, A. M., Lloyd, A., & Sakonju, S. (1991). Molecular definition of the morphogenetic and regulatory functions and the cis-regulatory elements of the *Drosophila* Abd-B homeotic gene. *Development*, 111(2), 393–405.
- Boyle, M., & DiNardo, S. (1995). Specification, migration and assembly of the somatic cells of the *Drosophila* gonad. *Development*, 121(6), 1815–1825.
- Bridges, C. B., & Morgan, T. H. (1923). *The third-chromosome group of mutant characters of Drosophila melanogaster* (Vol. 327, pp. 1–251). Washington: Carnegie Institution of Washington.
- Brookman, J. J., Toosy, A. T., Shashidhara, L. S., & White, R. A. (1992). The 412 retrotransposon and the development of gonadal mesoderm in *Drosophila*. *Development*, 116(4), 1185–1192.
- Brown, S., & Castelli-Gair Hombria, J. (2000). *Drosophila* grain encodes a GATA transcription factor required for cell rearrangement during morphogenesis. *Development*, 127(22), 4867–4876.
- Bryantsev, A. L., & Cripps, R. M. (2009). Cardiac gene regulatory networks in *Drosophila*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1789(4), 343–353.
- Burglin, T. R. (1997). Analysis of TALE superclass homeobox genes (MEIS, PBC, KNOX, Iroquois, TGIF) reveals a novel domain conserved between plants and animals. *Nucleic Acids Research*, 25(21), 4173–4180.
- Calzolari, S., Terriente, J., & Pujades, C. (2014). Cell segregation in the vertebrate hindbrain relies on actomyosin cables located at the interhombomeric boundaries. *The EMBO Journal*, 33(7), 686–701.

- Capovilla, M., Brandt, M., & Botas, J. (1994). Direct regulation of decapentaplegic by Ultrabithorax and its role in *Drosophila* midgut morphogenesis. *Cell*, 76(3), 461–475.
- Capovilla, M., Kambris, Z., & Botas, J. (2001). Direct regulation of the muscle-identity gene *apterous* by a Hox protein in the somatic mesoderm. *Development*, 128(8), 1221–1230.
- Casanova, J. (1989). Mutations in the *spalt* gene of *Drosophila* cause ectopic expression of *Ultrabithorax* and *Sex combs reduced*. *Roux's Archives of Developmental Biology*, 198, 137–140.
- Casares, F., & Mann, R. S. (1998). Control of antennal versus leg development in *Drosophila*. *Nature*, 392(6677), 723–726.
- Casares, F., Sánchez, L., Guerrero, I., & Sánchez-Herrero, E. (1997). The genital disc of *Drosophila melanogaster*. I. Segmental and compartmental organization. *Development Genes and Evolution*, 207, 216–228.
- Castelli-Gair, J. (1998). Implications of the spatial and temporal regulation of Hox genes on development and evolution. *International Journal of Developmental Biology*, 42(3), 437–444.
- Castelli-Gair, J., Greig, S., Micklem, G., & Akam, M. (1994). Dissecting the temporal requirements for homeotic gene function. *Development*, 120(7), 1983–1995.
- Castelli-Gair Hombria, J., Rivas, M. L., & Sotillos, S. (2009). Genetic control of morphogenesis—Hox induced organogenesis of the posterior spiracles. *International Journal of Developmental Biology*, 53(8–10), 1349–1358.
- Celniker, S. E., Keelan, D. J., & Lewis, E. B. (1989). The molecular genetics of the bithorax complex of *Drosophila*: Characterization of the products of the Abdominal-B domain. *Genes & Development*, 3(9), 1424–1436.
- Chadwick, R., Jones, B., Jack, T., & McGinnis, W. (1990). Ectopic expression from the Deformed gene triggers a dominant defect in *Drosophila* adult head development. *Development Biology*, 141(1), 130–140.
- Chadwick, R., & McGinnis, W. (1987). Temporal and spatial distribution of transcripts from the Deformed gene of *Drosophila*. *The EMBO Journal*, 6(3), 779–789.
- Chatterjee, S. S., Uppendahl, L. D., Chowdhury, M. A., Ip, P. L., & Siegal, M. L. (2011). The female-specific doublesex isoform regulates pleiotropic transcription factors to pattern genital development in *Drosophila*. *Development*, 138(6), 1099–1109.
- Chen, C. K., et al. (1998). The transcription factors KNIRPS and KNIRPS RELATED control cell migration and branch morphogenesis during *Drosophila* tracheal development. *Development*, 125(24), 4959–4968.
- Chiang, C., Young, K. E., & Beachy, P. A. (1995). Control of *Drosophila* tracheal branching by the novel homeodomain gene unplugged, a regulatory target for genes of the bithorax complex. *Development*, 121(11), 3901–3912.
- Choo, S. W., & Russell, S. (2011). Genomic approaches to understanding Hox gene function. *Advances in Genetics*, 76, 55–91.
- Choo, S. W., White, R., & Russell, S. (2011). Genome-wide analysis of the binding of the Hox protein Ultrabithorax and the Hox cofactor Homothorax in *Drosophila*. *PLoS ONE*, 6(4), e14778.
- Cimbora, D. M., & Sakonju, S. (1995). *Drosophila* midgut morphogenesis requires the function of the segmentation gene odd-paired. *Development Biology*, 169(2), 580–595.
- Cohen, S. M. (1990). Specification of limb development in the *Drosophila* embryo by positional cues from segmentation genes. *Nature*, 343(6254), 173–177.
- Cooke, J., et al. (2001). Eph signalling functions downstream of Val to regulate cell sorting and boundary formation in the caudal hindbrain. *Development*, 128(4), 571–580.
- Coutelis, J. B., et al. (2013). *Drosophila* left/right asymmetry establishment is controlled by the Hox gene abdominal-B. *Developmental Cell*, 24(1), 89–97.
- Crickmore, M. A., & Mann, R. S. (2006). Hox control of organ size by regulation of morphogen production and mobility. *Science*, 313(5783), 63–68.
- Crickmore, M. A., & Mann, R. S. (2007). Hox control of morphogen mobility and organ development through regulation of glypican expression. *Development*, 134(2), 327–334.

- Crozatier, M., Ubeda, J. M., Vincent, A., & Meister, M. (2004). Cellular immune response to parasitization in *Drosophila* requires the EBF orthologue collier. *PLoS Biology*, 2(8), E196.
- Curt, J. R., de Navas, L. F., & Sánchez-Herrero, E. (2013). Differential activity of *Drosophila* Hox genes induces myosin expression and can maintain compartment boundaries. *PLoS ONE*, 8(2), e57159.
- de Celis, J. F., Barrio, R., & Kafatos, F. C. (1996). A gene complex acting downstream of *dpp* in *Drosophila* wing morphogenesis. *Nature*, 381(6581), 421–424.
- de Navas, L. F., Garaulet, D. L., & Sánchez-Herrero, E. (2006). The ultrabithorax Hox gene of *Drosophila* controls haltere size by regulating the Dpp pathway. *Development*, 133(22), 4495–4506.
- DeFalco, T., Le Bras, S., & Van Doren, M. (2004). Abdominal-B is essential for proper sexually dimorphic development of the *Drosophila* gonad. *Mechanisms of Development*, 121(11), 1323–1333.
- Delorenzi, M., & Bienz, M. (1990). Expression of Abdominal-B homeoproteins in *Drosophila* embryos. *Development*, 108(2), 323–329.
- Diederich, R. J., Pattatucci, A. M., & Kaufman, T. C. (1991). Developmental and evolutionary implications of labial, Deformed and engrailed expression in the *Drosophila* head. *Development*, 113(1), 273–281.
- Donaldson, I. J., et al. (2012). Genome-wide occupancy links Hoxa2 to Wnt-beta-catenin signaling in mouse embryonic development. *Nucleic Acids Research*, 40(9), 3990–4001.
- Dong, P. D., Chu, J., & Panganiban, G. (2000). Coexpression of the homeobox genes Distal-less and homothorax determines *Drosophila* antennal identity. *Development*, 127(2), 209–216.
- Duboule, D., & Morata, G. (1994). Colinearity and functional hierarchy among genes of the homeotic complexes. *Trends in Genetics: TIG*, 10(10), 358–364.
- Duncan, D., Kiefl, P., & Duncan, I. (2010). Control of the spineless antennal enhancer: Direct repression of antennal target genes by Antennapedia. *Development Biology*, 347(1), 82–91.
- Duncan, D. M., Burgess, E. A., & Duncan, I. (1998). Control of distal antennal identity and tarsal development in *Drosophila* by spineless-aristapedia, a homolog of the mammalian dioxin receptor. *Genes & Development*, 12(9), 1290–1303.
- Dutta, D., Umashankar, M., Lewis, E. B., Rodrigues, V., & Vijayraghavan, K. (2010). Hox genes regulate muscle founder cell pattern autonomously and regulate morphogenesis through motor neurons. *Journal of Neurogenetics*, 24(3), 95–108.
- Elstob, P. R., Brodu, V., & Gould, A. P. (2001). spalt-dependent switching between two cell fates that are induced by the *Drosophila* EGF receptor. *Development*, 128(5), 723–732.
- Emerald, B. S., & Cohen, S. M. (2004). Spatial and temporal regulation of the homeotic selector gene Antennapedia is required for the establishment of leg identity in *Drosophila*. *Development Biology*, 267(2), 462–472.
- Emerald, B. S., Curtiss, J., Mlodzik, M., & Cohen, S. M. (2003). Distal antenna and distal antenna related encode nuclear proteins containing pipsqueak motifs involved in antenna development in *Drosophila*. *Development*, 130(6), 1171–1180.
- Enriquez, J., et al. (2010). Multi-step control of muscle diversity by Hox proteins in the *Drosophila* embryo. *Development*, 137(3), 457–466.
- Estella, C., & Mann, R. S. (2010). Non-redundant selector and growth-promoting functions of two sister genes, buttonhead and Sp1, in *Drosophila* leg development. *PLoS Genetics*, 6(6), e1001001.
- Estella, C., McKay, D. J., & Mann, R. S. (2008). Molecular integration of wingless, decapentaplegic, and autoregulatory inputs into Distalless during *Drosophila* leg development. *Developmental Cell*, 14(1), 86–96.
- Estella, C., Rieckhof, G., Calleja, M., & Morata, G. (2003). The role of buttonhead and Sp1 in the development of the ventral imaginal discs of *Drosophila*. *Development*, 130(24), 5929–5941.
- Estella, C., Voutev, R., & Mann, R. S. (2012). A dynamic network of morphogens and transcription factors patterns the fly leg. *Current Topics in Developmental Biology*, 98, 173–198.

- Estrada, B., Casares, F., & Sánchez-Herrero, E. (2003). Development of the genitalia in *Drosophila melanogaster*. *Differentiation*, 71(6), 299–310.
- Estrada, B., & Sánchez-Herrero, E. (2001). The Hox gene Abdominal-B antagonizes appendage development in the genital disc of *Drosophila*. *Development*, 128(3), 331–339.
- Fernandes, J., Celniker, S. E., Lewis, E. B., & VijayRaghavan, K. (1994). Muscle development in the four-winged *Drosophila* and the role of the Ultrabithorax gene. *Current Biology: CB*, 4(11), 957–964.
- Flenniken, A. M., Gale, N. W., Yancopoulos, G. D., & Wilkinson, D. G. (1996). Distinct and overlapping expression patterns of ligands for Eph-related receptor tyrosine kinases during mouse embryogenesis. *Development Biology*, 179(2), 382–401.
- Foronda, D., de Navas, L. F., Garaulet, D. L., & Sánchez-Herrero, E. (2009). Function and specificity of Hox genes. *International Journal of Developmental Biology*, 53(8–10), 1404–1419.
- Foronda, D., Estrada, B., de Navas, L., & Sánchez-Herrero, E. (2006). Requirement of Abdominal-A and Abdominal-B in the developing genitalia of *Drosophila* breaks the posterior downregulation rule. *Development*, 133(1), 117–127.
- Fox, R. M., Vaishnavi, A., Maruyama, R., & Andrew, D. J. (2013). Organ-specific gene expression: The bHLH protein Sage provides tissue specificity to *Drosophila* FoxA. *Development*, 140(10), 2160–2171.
- Fraser, S., Keynes, R., & Lumsden, A. (1990). Segmentation in the chick embryo hindbrain is defined by cell lineage restrictions. *Nature*, 344(6265), 431–435.
- Freeland, D. E., & Kuhn, D. T. (1996). Expression patterns of developmental genes reveal segment and parasegment organization of *D. melanogaster* genital discs. *Mechanisms of Development*, 56(1–2), 61–72.
- Frischer, L. E., Hagen, F. S., & Garber, R. L. (1986). An inversion that disrupts the Antennapedia gene causes abnormal structure and localization of RNAs. *Cell*, 47(6), 1017–1023.
- Funakoshi, Y., Minami, M., & Tabata, T. (2001). mtv shapes the activity gradient of the Dpp morphogen through regulation of thickveins. *Development*, 128(1), 67–74.
- Galant, R., Walsh, C. M., & Carroll, S. B. (2002). Hox repression of a target gene: Extradenticle-independent, additive action through multiple monomer binding sites. *Development*, 129(13), 3115–3126.
- García-Fernández, J. (2005a). The genesis and evolution of homeobox gene clusters. *Nature Reviews Genetics*, 6(12), 881–892.
- García-Fernández, J. (2005b). Hox, ParaHox, ProtoHox: Facts and guesses. *Heredity (Edinb)*, 94(2), 145–152.
- Gebelein, B., McKay, D. J., & Mann, R. S. (2004). Direct integration of Hox and segmentation gene inputs during *Drosophila* development. *Nature*, 431(7009), 653–659.
- Géminard, C., González-Morales, N., Coutelis, J. B., & Noselli, S. (2014). The myosin ID pathway and left-right asymmetry in *Drosophila*. *Genesis*, 52(6), 471–480.
- Glassford, W. J., et al. (2015). Co-option of an ancestral Hox-regulated network underlies a recently evolved morphological novelty. *Developmental Cell*, 34(5), 520–531.
- Glise, B., Bourbon, H., & Noselli, S. (1995). hemipterous encodes a novel *Drosophila* MAP kinase kinase, required for epithelial cell sheet movement. *Cell*, 83(3), 451–461.
- González-Crespo, S., & Morata, G. (1995). Control of *Drosophila* adult pattern by extradenticle. *Development*, 121(7), 2117–2125.
- González-Reyes, A., Urquía, N., Gehring, W. J., Struhl, G., & Morata, G. (1990). Are cross-regulatory interactions between homeotic genes functionally significant? *Nature*, 344(6261), 78–80.
- Gorfinkiel, N., Sánchez, L., & Guerrero, I. (1999). *Drosophila* terminalia as an appendage-like structure. *Mechanisms of Development*, 86(1–2), 113–123.
- Gould, A. P., Brookman, J. J., Strutt, D. I., & White, R. A. (1990). Targets of homeotic gene control in *Drosophila*. *Nature*, 348(6299), 308–312.
- Graba, Y., et al. (1992). Homeotic control in *Drosophila*; The scabrous gene is an in vivo target of Ultrabithorax proteins. *The EMBO Journal*, 11(9), 3375–3384.

- Greig, S., & Akam, M. (1993). Homeotic genes autonomously specify one aspect of pattern in the *Drosophila* mesoderm. *Nature*, 362(6421), 630–632.
- Greig, S., & Akam, M. (1995). The role of homeotic genes in the specification of the *Drosophila* gonad. *Current Biology: CB*, 5(9), 1057–1062.
- Grether, M. E., Abrams, J. M., Agapite, J., White, K., & Steller, H. (1995). The head involution defective gene of *Drosophila melanogaster* functions in programmed cell death. *Genes & Development*, 9(14), 1694–1708.
- Grienenberger, A., et al. (2003). Tgfbeta signaling acts on a Hox response element to confer specificity and diversity to Hox protein function. *Development*, 130(22), 5445–5455.
- Gummalla, M., et al. (2012). abd-A regulation by the iab-8 noncoding RNA. *PLoS Genetics*, 8(5), e1002720.
- Henderson, K. D., & Andrew, D. J. (2000). Regulation and function of Scr, exd, and hth in the *Drosophila* salivary gland. *Development Biology*, 217(2), 362–374.
- Henderson, K. D., Isaac, D. D., & Andrew, D. J. (1999). Cell fate specification in the *Drosophila* salivary gland: The integration of homeotic gene function with the DPP signaling cascade. *Development Biology*, 205(1), 10–21.
- Hersh, B. M., & Carroll, S. B. (2005). Direct regulation of knot gene expression by Ultrabithorax and the evolution of cis-regulatory elements in *Drosophila*. *Development*, 132(7), 1567–1577.
- Hersh, B. M., et al. (2007). The UBX-regulated network in the haltere imaginal disc of *D. melanogaster*. *Development Biology*, 302(2), 717–727.
- Heuer, J. G., & Kaufman, T. C. (1992). Homeotic genes have specific functional roles in the establishment of the *Drosophila* embryonic peripheral nervous system. *Development*, 115(1), 35–47.
- Holland, P. W. (2013). Evolution of homeobox genes. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Developmental Biology*, 2(1), 31–45.
- Holland, P. M., Suzanne, M., Campbell, J. S., Noselli, S., & Cooper, J. A. (1997). MKK7 is a stress-activated mitogen-activated protein kinase kinase functionally related to hemipterous. *Journal of Biological Chemistry*, 272(40), 24994–24998.
- Hombria, J. C., & Sotillos, S. (2013). JAK-STAT pathway in *Drosophila* morphogenesis: From organ selector to cell behavior regulator. *Jak-Stat*, 2(3), e26089.
- Hooper, J. E. (1986). Homeotic gene function in the muscles of *Drosophila* larvae. *The EMBO Journal*, 5(9), 2321–2329.
- Hoppler, S., & Bienz, M. (1994). Specification of a single cell type by a *Drosophila* homeotic gene. *Cell*, 76(4), 689–702.
- Hozumi, S., et al. (2006). An unconventional myosin in *Drosophila* reverses the default handedness in visceral organs. *Nature*, 440(7085), 798–802.
- Hu, N., & Castelli-Gair, J. (1999). Study of the posterior spiracles of *Drosophila* as a model to understand the genetic and cellular mechanisms controlling morphogenesis. *Developmental Biology*, 214, 197–210.
- Hueber, S. D., & Lohmann, I. (2008). Shaping segments: Hox gene function in the genomic age. *Bioessays*, 30(10), 965–979.
- Hueber, S. D., Weiller, G. F., Djordjevic, M. A., & Frickey, T. (2010). Improving Hox protein classification across the major model organisms. *PLoS ONE*, 5(5), e10820.
- Hueber, S. D., et al. (2007). Comparative analysis of Hox downstream genes in *Drosophila*. *Development*, 134(2), 381–392.
- Iimura, T., Denans, N., & Pourquie, O. (2009). Establishment of Hox vertebral identities in the embryonic spine precursors. *Current Topics in Developmental Biology*, 88, 201–234.
- Immerglück, K., Lawrence, P. A., & Bienz, M. (1990). Induction across germ layers in *Drosophila* mediated by a genetic cascade. *Cell*, 62(2), 261–268.
- Jiang, L., & Crews, S. T. (2003). The *Drosophila* dysfusion basic helix-loop-helix (bHLH)-PAS gene controls tracheal fusion and levels of the trachealess bHLH-PAS protein. *Molecular and Cellular Biology*, 23(16), 5625–5637.

- Jimenez-Guri, E., et al. (2010). Clonal analysis in mice underlines the importance of rhombomeric boundaries in cell movement restriction during hindbrain segmentation. *PLoS ONE*, 5(4), e10112.
- Jones, B., & McGinnis, W. (1993). The regulation of empty spiracles by Abdominal-B mediates an abdominal segment identity function. *Genes & Development*, 7(2), 229–240.
- Joulia, L., Bourbon, H. M., & Cribbs, D. L. (2005). Homeotic proboscipedia function modulates hedgehog-mediated organizer activity to pattern adult *Drosophila* mouthparts. *Development Biology*, 278(2), 496–510.
- Joulia, L., Deutsch, J., Bourbon, H. M., & Cribbs, D. L. (2006). The specification of a highly derived arthropod appendage, the *Drosophila* labial palps, requires the joint action of selectors and signaling pathways. *Development Genes and Evolution*, 216(7–8), 431–442.
- Karess, R. E., et al. (1991). The regulatory light chain of nonmuscle myosin is encoded by spaghetti-squash, a gene required for cytokinesis in *Drosophila*. *Cell*, 65(7), 1177–1189.
- Kaufman, T. C. (1978). Cytogenetic Analysis of Chromosome 3 in *Drosophila melanogaster*: Isolation and characterization of four new alleles of the proboscipedia (pb) locus. *Genetics*, 90(3), 579–596.
- Kaufman, T. C., Lewis, R., & Wakimoto, B. (1980). Cytogenetic analysis of chromosome 3 in *Drosophila melanogaster*: The homeotic gene complex in polytene chromosome interval 84a-B. *Genetics*, 94(1), 115–133.
- Kaufman, T. C., Seeger, M. A., & Olsen, G. (1990). Molecular and genetic organization of the antennapedia gene complex of *Drosophila melanogaster*. *Advances in Genetics*, 27, 309–362.
- Keisman, E. L., & Baker, B. S. (2001). The *Drosophila* sex determination hierarchy modulates wingless and decapentaplegic signaling to deploy dachshund sex-specifically in the genital imaginal disc. *Development*, 128(9), 1643–1656.
- Keisman, E. L., Christiansen, A. E., & Baker, B. S. (2001). The sex determination gene doublesex regulates the A/P organizer to direct sex-specific patterns of growth in the *Drosophila* genital imaginal disc. *Developmental Cell*, 1(2), 215–225.
- Kitadate, Y., Shigenobu, S., Arita, K., & Kobayashi, S. (2007). Boss/Sev signaling from germline to soma restricts germline-stem-cell-niche formation in the anterior region of *Drosophila* male gonads. *Developmental Cell*, 13(1), 151–159.
- Klebes, A., Biehls, B., Cifuentes, F., & Kornberg, T. B. (2002). Expression profiling of *Drosophila* imaginal discs. *Genome Biology*, 3(8):RESEARCH0038.
- Kojima, T. (2004). The mechanism of *Drosophila* leg development along the proximodistal axis. *Development, Growth & Differentiation*, 46(2), 115–129.
- Kolsch, V., Seher, T., Fernandez-Ballester, G. J., Serrano, L., & Leptin, M. (2007). Control of *Drosophila* gastrulation by apical localization of adherens junctions and RhoGEF2. *Science*, 315(5810), 384–386.
- Kuranaga, E., et al. (2011). Apoptosis controls the speed of looping morphogenesis in *Drosophila* male terminalia. *Development*, 138(8), 1493–1499.
- Kuziora, M. A. (1993). Abdominal-B protein isoforms exhibit distinct cuticular transformations and regulatory activities when ectopically expressed in *Drosophila* embryos. *Mechanisms of Development*, 42(3), 125–137.
- LaBeau, E. M., Trujillo, D. L., & Cripps, R. M. (2009). Bithorax complex genes control alary muscle patterning along the cardiac tube of *Drosophila*. *Mechanisms of Development*, 126(5–6), 478–486.
- Lamka, M. L., Boulet, A. M., & Sakonju, S. (1992). Ectopic expression of UBX and ABD-B proteins during *Drosophila* embryogenesis: Competition, not a functional hierarchy, explains phenotypic suppression. *Development*, 116(4), 841–854.
- Lawrence, P. A., & Johnston, P. (1986). The muscle pattern of a segment of *Drosophila* may be determined by neurons and not by contributing myoblasts. *Cell*, 45(4), 505–513.
- Le Bras, S., & Van Doren, M. (2006). Development of the male germline stem cell niche in *Drosophila*. *Development Biology*, 294(1), 92–103.
- Lee, J. R., Urban, S., Garvey, C. F., & Freeman, M. (2001). Regulated intracellular ligand transport and proteolysis control EGF signal activation in *Drosophila*. *Cell*, 107(2), 161–171.

- Lewis, E. B. (1963). Genes and developmental pathways. *American Zoologist*, 3, 33–56.
- Lewis, E. B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature*, 276, 565–570.
- Lewis, E. B. (1998). The bithorax complex: The first fifty years. *International Journal of Developmental Biology*, 42(3), 403–415.
- Lewis, R. A., Kaufman, T. C., Denell, R. E., & Tollerico, P. (1980). Genetic analysis of the antennapedia gene complex (Ant-C) and adjacent chromosomal regions of *Drosophila melanogaster*. I. Polytene Chromosome Segments 84b-D. *Genetics*, 95(2), 367–381.
- Li-Kroeger, D., Cook, T. A., & Gebelein, B. (2012). Integration of an abdominal Hox complex with Pax2 yields cell-specific EGF secretion from *Drosophila* sensory precursor cells. *Development*, 139(9), 1611–1619.
- Li-Kroeger, D., Witt, L. M., Grimes, H. L., Cook, T. A., & Gebelein, B. (2008). Hox and senseless antagonism functions as a molecular switch to regulate EGF secretion in the *Drosophila* PNS. *Developmental Cell*, 15(2), 298–308.
- Lo, P. C., Skeath, J. B., Gajewski, K., Schulz, R. A., & Frasch, M. (2002). Homeotic genes autonomously specify the anteroposterior subdivision of the *Drosophila* dorsal vessel into aorta and heart. *Development Biology*, 251(2), 307–319.
- Lohmann, I., McGinnis, N., Bodmer, M., & McGinnis, W. (2002). The *Drosophila* Hox gene deformed sculpts head morphology via direct regulation of the apoptosis activator reaper. *Cell*, 110(4), 457–466.
- Longobardi, E., et al. (2014). Biochemistry of the tale transcription factors PREP, MEIS, and PBX in vertebrates. *Developmental Dynamics*, 243(1), 59–75.
- Lovato, T. L., Nguyen, T. P., Molina, M. R., & Cripps, R. M. (2002). The Hox gene abdominal—A specifies heart cell fate in the *Drosophila* dorsal vessel. *Development*, 129(21), 5019–5027.
- Lovegrove, B., et al. (2006). Coordinated control of cell adhesion, polarity, and cytoskeleton underlies Hox-induced organogenesis in *Drosophila*. *Current Biology: CB*, 16(22), 2206–2216.
- Lumsden, A., & Keynes, R. (1989). Segmental patterns of neuronal development in the chick hindbrain. *Nature*, 337(6206), 424–428.
- Macías, A., et al. (2004). PVF1/PVR signaling and apoptosis promotes the rotation and dorsal closure of the *Drosophila* male terminalia. *International Journal of Developmental Biology*, 48(10), 1087–1094.
- Madhavan, M. M., & Schneidermann, H. A. (1977). Histological analysis of the dynamics of growth of imaginal discs and histoblast nests during the larval development of *Drosophila melanogaster* Roux Arch. *Development Biology*, 183, 269–305.
- Makhijani, K., Kalyani, C., Srividya, T., & Shashidhara, L. S. (2007). Modulation of Decapentaplegic gradient during haltere specification in *Drosophila*. *Development Biology*, 302(1), 243–255.
- Manak, J. R., Mathies, L. D., & Scott, M. P. (1995). Regulation of a decapentaplegic midgut enhancer by homeotic proteins. *Development*, 120(12), 3605–3619.
- Mandal, L., Martinez-Agosto, J. A., Evans, C. J., Hartenstein, V., & Banerjee, U. (2007). A Hedgehog- and Antennapedia-dependent niche maintains *Drosophila* haematopoietic precursors. *Nature*, 446(7133), 320–324.
- Mann, R. S., Lelli, K. M., & Joshi, R. (2009). Hox specificity unique roles for cofactors and collaborators. *Current Topics in Developmental Biology*, 88, 63–101.
- Manning, G., & Krasnow, M. A. (1993). Development of the *Drosophila* tracheal system. In M. Bate & A. M. Arias (Eds.), *The development of Drosophila melanogaster* (Vol. 1, pp. 609–685). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Martinez-Arias, A., Ingham, P. W., Scott, M. P., & Akam, M. E. (1987). The spatial and temporal deployment of Dfd and Scr transcripts throughout development of *Drosophila*. *Development*, 100(4), 673–683.
- Martinez-Arias, A., & Lawrence, P. A. (1985). Parasegments and compartments in the *Drosophila* embryo. *Nature*, 313(6004), 639–642.

- Mastick, G. S., McKay, R., Oligino, T., Donovan, K., & Lopez, A. J. (1995). Identification of target genes regulated by homeotic proteins in *Drosophila melanogaster* through genetic selection of Ultrabithorax protein-binding sites in yeast. *Genetics*, *139*(1), 349–363.
- Mathies, L. D., Kerridge, S., & Scott, M. P. (1994). Role of the teashirt gene in *Drosophila* midgut morphogenesis: Secreted proteins mediate the action of homeotic genes. *Development*, *120*(10), 2799–2809.
- Matsuda, R., Hosono, C., Saigo, K., & Samakovlis, C. (2015). The intersection of the extrinsic hedgehog and WNT/wingless signals with the intrinsic Hox code underpins branching pattern and tube shape diversity in the *Drosophila* airways. *PLoS Genetics*, *11*(1), e1004929.
- Maurel-Zaffran, C., Pradel, J., & Graba, Y. (2010). Reiterative use of signalling pathways controls multiple cellular events during *Drosophila* posterior spiracle organogenesis. *Development Biology*, *343*(1–2), 18–27.
- McCabe, C. D., & Innis, J. W. (2005). A genomic approach to the identification and characterization of HOXA13 functional binding elements. *Nucleic Acids Research*, *33*(21), 6782–6794.
- McGinnis, W., Garber, R. L., Wirz, J., Kuroiwa, A., & Gehring, W. J. (1984a). A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans. *Cell*, *37*(2), 403–408.
- McGinnis, W., Hart, C. P., Gehring, W. J., & Ruddle, F. H. (1984b). Molecular cloning and chromosome mapping of a mouse DNA sequence homologous to homeotic genes of *Drosophila*. *Cell*, *38*(3), 675–680.
- McGinnis, W., Levine, M. S., Hafen, E., Kuroiwa, A., & Gehring, W. J. (1984c). A conserved DNA sequence in homeotic genes of the *Drosophila* Antennapedia and bithorax complexes. *Nature*, *308*(5958), 428–433.
- McKay, D. J., Estella, C., & Mann, R. S. (2009). The origins of the *Drosophila* leg revealed by the cis-regulatory architecture of the Distalless gene. *Development*, *136*(1), 61–71.
- Medioni, C., et al. (2009). The fabulous destiny of the *Drosophila* heart. *Current Opinion in Genetics & Development*, *19*(5), 518–525.
- Mellitzer, G., Xu, Q., & Wilkinson, D. G. (1999). Eph receptors and ephrins restrict cell intermingling and communication. *Nature*, *400*(6739), 77–81.
- Merabet, S., Ebner, A., & Affolter, M. (2005a). The *Drosophila* Extradenticle and Homothorax selector proteins control branchless/FGF expression in mesodermal bridge-cells. *EMBO Reports*, *6*(8), 762–768.
- Merabet, S., Hombria, J. C., Hu, N., Pradel, J., & Graba, Y. (2005b). Hox-controlled reorganisation of intrasegmental patterning cues underlies *Drosophila* posterior spiracle organogenesis. *Development*, *132*(13), 3093–3102.
- Merrill, V. K., Diederich, R. J., Turner, F. R., & Kaufman, T. C. (1989). A genetic and developmental analysis of mutations in labial, a gene necessary for proper head formation in *Drosophila melanogaster*. *Development Biology*, *135*(2), 376–391.
- Merrill, V. K., Turner, F. R., & Kaufman, T. C. (1987). A genetic and developmental analysis of mutations in the Deformed locus in *Drosophila melanogaster*. *Development Biology*, *122*(2), 379–395.
- Michelson, A. M. (1994). Muscle pattern diversification in *Drosophila* is determined by the autonomous function of homeotic genes in the embryonic mesoderm. *Development*, *120*(4), 755–768.
- Miller, D. F., et al. (2001). Cross-regulation of Hox genes in the *Drosophila melanogaster* embryo. *Mechanisms of Development*, *102*(1–2), 3–16.
- Minguillon, C., Del Buono, J., & Logan, M. P. (2005). Tbx5 and Tbx4 are not sufficient to determine limb-specific morphologies but have common roles in initiating limb outgrowth. *Developmental Cell*, *8*(1), 75–84.
- Minguillon, C., et al. (2012). Hox genes regulate the onset of Tbx5 expression in the forelimb. *Development*, *139*(17), 3180–3188.

- Mohit, P., et al. (2006). Modulation of AP and DV signaling pathways by the homeotic gene Ultrabithorax during haltere development in *Drosophila*. *Development Biology*, 291(2), 356–367.
- Monier, B., Astier, M., Sémériva, M., & Perrin, L. (2005). Steroid-dependent modification of Hox function drives myocyte reprogramming in the *Drosophila* heart. *Development*, 132(23), 5283–5293.
- Monier, B., Tevy, M. F., Perrin, L., Capovilla, M., & Sémériva, M. (2007). Downstream of homeotic genes: In the heart of Hox function. *Fly (Austin)*, 1(2), 59–67.
- Moore, L. A., Broihier, H. T., Van Doren, M., & Lehmann, R. (1998). Gonadal mesoderm and fat body initially follow a common developmental path in *Drosophila*. *Development*, 125(5), 837–844.
- Morata, G., & García-Bellido, A. (1976). Developmental analysis of some mutants of the bithorax system of *Drosophila*. *Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology*, 179, 125–143.
- Morin-Poulard, I., Louradour, I., Vanzo, N., & Crozatier, M. (2014). The *drosophila* hematopoietic niche. *Medicine Sciences: M/S (Paris)*, 30(1), 76–81.
- Mukherjee, K., & Burglin, T. R. (2007). Comprehensive analysis of animal TALE homeobox genes: New conserved motifs and cases of accelerated evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 65(2), 137–153.
- Myat, M. M., & Andrew, D. J. (2000). Fork head prevents apoptosis and promotes cell shape change during formation of the *Drosophila* salivary glands. *Development*, 127(19), 4217–4226.
- Narita, Y., & Rijli, F. M. (2009). Hox genes in neural patterning and circuit formation in the mouse hindbrain. *Current Topics in Developmental Biology*, 88, 139–167.
- Nieto, M. A., Gilardi-Hebenstreit, P., Charnay, P., & Wilkinson, D. G. (1992). A receptor protein tyrosine kinase implicated in the segmental patterning of the hindbrain and mesoderm. *Development*, 116(4), 1137–1150.
- Nishimoto, S., Minguillon, C., Wood, S., & Logan, M. P. (2014). A combination of activation and repression by a colinear Hox code controls forelimb-restricted expression of *Tbx5* and reveals Hox protein specificity. *PLoS Genetics*, 10(3), e1004245.
- Nöthiger, R., Dübendorfer, A., & Epper, F. (1977). Gynandromorphs reveal two separate primordia for male and female genitalia. *Roux's Archives of Developmental Biology*, 181, 367–373.
- Noyes, M. B., et al. (2008). Analysis of homeodomain specificities allows the family-wide prediction of preferred recognition sites. *Cell*, 133(7), 1277–1289.
- Pallavi, S. K., Kannan, R., & Shashidhara, L. S. (2006). Negative regulation of *Egfr/Ras* pathway by Ultrabithorax during haltere development in *Drosophila*. *Development Biology*, 296(2), 340–352.
- Panganiban, G. E., Reuter, R., Scott, M. P., & Hoffmann, F. M. (1990). A *Drosophila* growth factor homolog, decapentaplegic, regulates homeotic gene expression within and across germ layers during midgut morphogenesis. *Development*, 110(4), 1041–1050.
- Panzer, S., Weigel, D., & Beckendorf, S. K. (1992). Organogenesis in *Drosophila melanogaster*: Embryonic salivary gland determination is controlled by homeotic and dorsoventral patterning genes. *Development*, 114(1), 49–57.
- Papagiannouli, F., Schardt, L., Grajcarek, J., Ha, N., & Lohmann, I. (2014). The Hox gene *Abd-B* controls stem cell niche function in the *Drosophila* testis. *Developmental Cell*, 28(2), 189–202.
- Pattatucci, A. M., Otteson, D. C., & Kaufman, T. C. (1991). A functional and structural analysis of the Sex combs reduced locus of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 129(2), 423–441.
- Pavlopoulos, A., & Akam, M. (2011). Hox gene Ultrabithorax regulates distinct sets of target genes at successive stages of *Drosophila* haltere morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 108(7), 2855–2860.
- Pearson, J. C., Lemons, D., & McGinnis, W. (2005). Modulating Hox gene functions during animal body patterning. *Nature Reviews Genetics*, 6(12), 893–904.
- Pennetier, D., et al. (2012). Size control of the *Drosophila* hematopoietic niche by bone morphogenetic protein signaling reveals parallels with mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 109(9), 3389–3394.

- Percival-Smith, A., Sivanantharajah, L., Pelling, J. J., & Teft, W. A. (2013). Developmental competence and the induction of ectopic proboscises in *Drosophila melanogaster*. *Development Genes and Evolution*, 223(6), 375–387.
- Percival-Smith, A., Weber, J., Gilfoyle, E., & Wilson, P. (1997). Genetic characterization of the role of the two HOX proteins, Proboscipedia and Sex Combs Reduced, in determination of adult antennal, tarsal, maxillary palp and proboscis identities in *Drosophila melanogaster*. *Development*, 124(24), 5049–5062.
- Perrin, L., Monier, B., Ponzielli, R., Astier, M., & Sémériva, M. (2004). *Drosophila* cardiac tube organogenesis requires multiple phases of Hox activity. *Development Biology*, 272(2), 419–431.
- Petzoldt, A. G., et al. (2012). DE-Cadherin regulates unconventional Myosin ID and Myosin IC in *Drosophila* left-right asymmetry establishment. *Development*, 139(10), 1874–1884.
- Pinto, P. B., Espinosa-Vázquez, J. M., Rivas, M. L., & Hombria, J. C. (2015). JAK/STAT and Hox dynamic interactions in an organogenetic gene cascade. *PLoS Genetics*, 11(7), e1005412.
- Ponzielli, R., et al. (2002). Heart tube patterning in *Drosophila* requires integration of axial and segmental information provided by the Bithorax Complex genes and hedgehog signaling. *Development*, 129(19), 4509–4521.
- Prasad, M., Bajpai, R., & Shashidhara, L. S. (2003). Regulation of Wingless and Vestigial expression in wing and haltere discs of *Drosophila*. *Development*, 130(8), 1537–1547.
- Prin, F., Serpente, P., Itasaki, N., & Gould, A. P. (2014). Hox proteins drive cell segregation and non-autonomous apical remodelling during hindbrain segmentation. *Development*, 141(7), 1492–1502.
- Rallis, C., et al. (2003). Tbx5 is required for forelimb bud formation and continued outgrowth. *Development*, 130(12), 2741–2751.
- Rauskolb, C., Smith, K. M., Peifer, M., & Wieschaus, E. (1995). extradenticle determines segmental identities throughout *Drosophila* development. *Development*, 121(11), 3663–3673.
- Rauskolb, C., & Wieschaus, E. (1994). Coordinate regulation of downstream genes by extradenticle and the homeotic selector proteins. *The EMBO Journal*, 13(15), 3561–3569.
- Regulski, M., McGinnis, N., Chadwick, R., & McGinnis, W. (1987). Developmental and molecular analysis of *Deformed*; A homeotic gene controlling *Drosophila* head development. *EMBO Journal*, 6, 767–777.
- Reuter, R., & Scott, M. P. (1990). Expression and function of the homeobox genes Antennapedia and Sex combs reduced in the embryonic midgut of *Drosophila*. *Development*, 109(2), 289–304.
- Rezsóhazy, R., Saurin, A. J., Maurel-Zaffran, C., & Graba, Y. (2015). Cellular and molecular insights into Hox protein action. *Development*, 142(7), 1212–1227.
- Riechmann, V., Rehorn, K. P., Reuter, R., & Leptin, M. (1998). The genetic control of the distinction between fat body and gonadal mesoderm in *Drosophila*. *Development*, 125(4), 713–723.
- Rivas, M. L., et al. (2013). Antagonism versus cooperativity with TALE cofactors at the base of the functional diversification of Hox protein function. *PLoS Genetics*, 9(2), e1003252.
- Roch, F., & Akam, M. (2000). Ultrabithorax and the control of cell morphology in *Drosophila* halteres. *Development*, 127(1), 97–107.
- Rodríguez, A., et al. (1996). Identification of immune system and response genes, and novel mutations causing melanotic tumor formation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 143(2), 929–940.
- Rousset, R., et al. (2010). The *Drosophila* serine protease homologue Scarface regulates JNK signalling in a negative-feedback loop during epithelial morphogenesis. *Development*, 137(13), 2177–2186.
- Rozowski, M., & Akam, M. (2002). Hox gene control of segment-specific bristle patterns in *Drosophila*. *Genes & Development*, 16(9), 1150–1162.
- Ryan, K. M., Hoshizaki, D. K., & Cripps, R. M. (2005). Homeotic selector genes control the patterning of seven-up expressing cells in the *Drosophila* dorsal vessel. *Mechanisms of Development*, 122(9), 1023–1033.

- Ryoo, H. D., & Mann, R. S. (1999). The control of trunk Hox specificity and activity by Extradenticle. *Genes & Development*, 13(13), 1704–1716.
- Samakovlis, C., et al. (1996). Development of the *Drosophila* tracheal system occurs by a series of morphologically distinct but genetically coupled branching events. *Development*, 122(5), 1395–1407.
- Sambrani, N., et al. (2013). Distinct molecular strategies for Hox-mediated limb suppression in *Drosophila*: From cooperativity to dispensability/antagonism in TALE partnership. *PLoS Genetics*, 9(3), e1003307.
- Sánchez, L., Gorfinkiel, N., & Guerrero, I. (2001). Sex determination genes control the development of the *Drosophila* genital disc, modulating the response to Hedgehog, Wingless and Decapentaplegic signals. *Development*, 128(7), 1033–1043.
- Sánchez-Herrero, E. (2013). Hox targets and cellular functions. *Scientifica (Cairo)*, 2013, 738257.
- Sánchez-Herrero, E., Vernós, I., Marco, R., & Morata, G. (1985). Genetic organisation of the *Drosophila* bithorax complex. *Nature*, 313, 108–113.
- Sánchez-Higuera, C., Sotillos, S., & Hombria, J. C. G. (2014). Common origin of insect trachea and endocrine organs from a segmentally repeated precursor. *Current Biology: CB*, 24(1), 76–81.
- Santos, A. C., & Lehmann, R. (2004). Germ cell specification and migration in *Drosophila* and beyond. *Current Biology: CB*, 14(14), R578–R589.
- Sato, M., Kitada, Y., & Tabata, T. (2008). Larval cells become imaginal cells under the control of homothorax prior to metamorphosis in the *Drosophila* tracheal system. *Development Biology*, 318(2), 247–257.
- Schaub, C., & Frasch, M. (2013). Org-1 is required for the diversification of circular visceral muscle founder cells and normal midgut morphogenesis. *Development Biology*, 376(2), 245–259.
- Schneuwly, S., Klemen, R., & Gehring, W. J. (1987a). Redesigning the body plan of *Drosophila* by ectopic expression of the homeotic gene Antennapedia. *Nature*, 325(6107), 816–818.
- Schneuwly, S., Kuroiwa, A., & Gehring, W. J. (1987b). Molecular analysis of the dominant homeotic Antennapedia phenotype. *The EMBO Journal*, 6(1), 201–206.
- Scott, M. P., & Weiner, A. J. (1984). Structural relationships among genes that control development: Sequence homology between the Antennapedia, Ultrabithorax, and fushi tarazu loci of *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 81(13), 4115–4119.
- Shashidhara, L. S., Agrawal, N., Bajpai, R., Bharathi, V., & Sinha, P. (1999). Negative regulation of dorsoventral signaling by the homeotic gene Ultrabithorax during haltere development in *Drosophila*. *Development Biology*, 212(2), 491–502.
- Shroff, S., Joshi, M., & Orenic, T. V. (2007). Differential Delta expression underlies the diversity of sensory organ patterns among the legs of the *Drosophila* adult. *Mechanisms of Development*, 124(1), 43–58.
- Simões, S., et al. (2006). Compartmentalisation of Rho regulators directs cell invagination during tissue morphogenesis. *Development*, 133(21), 4257–4267.
- Singh, N. P., & Mishra, R. K. (2014). Role of abd-A and Abd-B in development of abdominal epithelia breaks posterior prevalence rule. *PLoS Genetics*, 10(10), e1004717.
- Slattery, M., Ma, L., Negre, N., White, K. P., & Mann, R. S. (2011). Genome-wide tissue-specific occupancy of the Hox protein Ultrabithorax and Hox cofactor Homothorax in *Drosophila*. *PLoS ONE*, 6(4), e14686.
- Sotillos, S., Aguilar, M., & Hombria, J. C. (2013a). Forces shaping a Hox morphogenetic gene network. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 110(11), 4303–4308.
- Sotillos, S., Espinosa-Vázquez, J. M., Foglia, F., Hu, N., & Hombria, J. C. (2010). An efficient approach to isolate STAT regulated enhancers uncovers STAT92E fundamental role in *Drosophila* tracheal development. *Development Biology*, 340(2), 571–582.
- Sotillos, S., Krahn, M., Espinosa-Vázquez, J. M., & Hombria, J. C. (2013b). Src kinases mediate the interaction of the apical determinant Bazooka/PAR3 with STAT92E and increase signalling efficiency in *Drosophila* ectodermal cells. *Development*, 140(7), 1507–1516.

- Speder, P., Adam, G., & Noselli, S. (2006). Type ID unconventional myosin controls left-right asymmetry in *Drosophila*. *Nature*, 440(7085), 803–807.
- Stobe, P., et al. (2009). Multifactorial regulation of a hox target gene. *PLoS Genetics*, 5(3), e1000412.
- Struhl, G. (1981). A homeotic mutation transforming leg to antenna in *Drosophila*. *Nature*, 292(5824), 635–638.
- Struhl, G. (1982). Genes controlling segmental specification in the *Drosophila* thorax. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 79(23), 7380–7384.
- Struhl, G., & White, R. A. H. (1985). Regulation of the *Ultrabithorax* gene of *Drosophila* by the other bithorax complex genes. *Cell*, 43, 507–519.
- Suzanne, M., et al. (2010). Coupling of apoptosis and L/R patterning controls stepwise organ looping. *Current Biology: CB*, 20(19), 1773–1778.
- Swope, D., Kramer, J., King, T. R., Cheng, Y. S., & Kramer, S. G. (2014). Cdc42 is required in a genetically distinct subset of cardiac cells during *Drosophila* dorsal vessel closure. *Development Biology*, 392(2), 221–232.
- Tanaka, K., Barmina, O., Sanders, L. E., Arbeitman, M. N., & Kopp, A. (2011). Evolution of sex-specific traits through changes in HOX-dependent doublesex expression. *PLoS Biology*, 9(8), e1001131.
- Tao, Y., & Schulz, R. A. (2007). Heart development in *Drosophila*. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 18(1), 3–15.
- Thüringer, F., & Bienz, M. (1993). Indirect autoregulation of a homeotic *Drosophila* gene mediated by extracellular signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 90(9), 3899–3903.
- Tiberghien, M. A., Lebreton, G., Cribbs, D., Benassayag, C., & Suzanne, M. (2015). The Hox gene *Dfd* controls organogenesis by shaping territorial border through regulation of basal DE-Cadherin distribution. *Development Biology*, 405(2), 183–188.
- Tiong, S., Bone, L. M., & Whittle, J. R. (1985). Recessive lethal mutations within the bithorax-complex in *Drosophila*. *Molecular and General Genetics*, 200(2), 335–342.
- Tremml, G., & Bienz, M. (1989). Homeotic gene expression in the visceral mesoderm of *Drosophila* embryos. *The EMBO Journal*, 8(9), 2677–2685.
- Tsikala, G., Karagogeos, D., & Strigini, M. (2014). Btk-dependent epithelial cell rearrangements contribute to the invagination of nearby tubular structures in the posterior spiracles of *Drosophila*. *Development Biology*, 396(1), 42–56.
- Vachon, G., et al. (1992). Homeotic genes of the Bithorax complex repress limb development in the abdomen of the *Drosophila* embryo through the target gene *Distal-less*. *Cell*, 71(3), 437–450.
- Vinagre, T., et al. (2010). Evidence for a myotomal Hox/Myf cascade governing nonautonomous control of rib specification within global vertebral domains. *Developmental Cell*, 18(4), 655–661.
- Wagner-Bernholz, J. T., Wilson, C., Gibson, G., Schuh, R., & Gehring, W. J. (1991). Identification of target genes of the homeotic gene *Antennapedia* by enhancer detection. *Genes & Development*, 5(12B), 2467–2480.
- Walsh, C. M., & Carroll, S. B. (2007). Collaboration between Smads and a Hox protein in target gene repression. *Development*, 134(20), 3585–3592.
- Weatherbee, S. D., Halder, G., Kim, J., Hudson, A., & Carroll, S. (1998). *Ultrabithorax* regulates genes at several levels of the wing-patterning hierarchy to shape the development of the *Drosophila* haltere. *Genes & Development*, 12(10), 1474–1482.
- Wodarz, A., Hinz, U., Engelbert, M., & Knust, E. (1995). Expression of *crumbs* confers apical character on plasma membrane domains of ectodermal epithelia of *Drosophila*. *Cell*, 82(1), 67–76.
- Wolf, C., & Schuh, R. (2000). Single mesodermal cells guide outgrowth of ectodermal tubular structures in *Drosophila*. *Genes & Development*, 14(17), 2140–2145.

- Xu, Q., Alldus, G., Holder, N., & Wilkinson, D. G. (1995). Expression of truncated Sek-1 receptor tyrosine kinase disrupts the segmental restriction of gene expression in the *Xenopus* and zebrafish hindbrain. *Development*, 121(12), 4005–4016.
- Xu, Q., Mellitzer, G., Robinson, V., & Wilkinson, D. G. (1999). In vivo cell sorting in complementary segmental domains mediated by Eph receptors and ephrins. *Nature*, 399(6733), 267–271.
- Yang, X., et al. (2000). decapentaplegic is a direct target of dTcf repression in the *Drosophila* visceral mesoderm. *Development*, 127(17), 3695–3702.
- Zaffran, S., Kuchler, A., Lee, H. H., & Frasch, M. (2001). biniou (FoxF), a central component in a regulatory network controlling visceral mesoderm development and midgut morphogenesis in *Drosophila*. *Genes & Development*, 15(21), 2900–2915.
- Zavortink, M., & Sakonju, S. (1989). The morphogenetic and regulatory functions of the *Drosophila* Abdominal-B gene are encoded in overlapping RNAs transcribed from separate promoters. *Genes & Development*, 3(12A), 1969–1981.
- Zhai, Z., et al. (2012). Antagonistic regulation of apoptosis and differentiation by the Cut transcription factor represents a tumor-suppressing mechanism in *Drosophila*. *PLoS Genetics*, 8(3), e1002582.
- Zhou, B., Bagri, A., & Beckendorf, S. K. (2001). Salivary gland determination in *Drosophila*: A salivary-specific, fork head enhancer integrates spatial pattern and allows fork head autoregulation. *Development Biology*, 237(1), 54–67.

RESULTADOS SUPLEMENTARIOS

1. Análisis genético del requerimiento de *ventral veinless* en los precursores endocrinos
2. Análisis genético y bioquímico de la regulación de los *enhancers* *vv1+2* y *snail*-rg por genes Hox
3. Identificación de nuevos reguladores genéticos del *enhancer* *snail*-rg
4. Supresión específica de la función de *snail* en los primordios del *corpora allata* y la glándula protorácica mediante el sistema CRISPR/Cas9
5. Análisis del comportamiento celular de los primordios del *corpora allata* y la glándula protorácica
6. Búsqueda de los precursores endocrinos en embriones de otras especies de artrópodos

1. Análisis genético del requerimiento de *ventral veinless* en los precursores endocrinos

En esta sección se presentan resultados no publicados, relacionados con la regulación de los *enhancers* *vv1+2* y *snail-rg*.

1.1 Requerimiento temporal de *ventral veinless* en los precursores endocrinos de *Drosophila melanogaster*.

La expresión de *Ventral veinless* se activa en el estadio 10 del desarrollo embrionario, en grupos de células ectodérmicas localizadas en un patrón segmentalmente repetido desde los segmentos cefálicos hasta el noveno segmento abdominal. Esta expresión inicial está dirigida por el *enhancer* *vv1+2* que solamente permanece activo hasta el estadio 11 (Sotillos et al., 2010). Como hemos mostrado, la expresión de *vv1+2* requiere tanto los genes Hox anteriores *Dfd* y *Scr*, así como los Hox troncales *Antp*, *Ubx*, *abd-A* y el posterior *Abd-B*. Las células de los segmentos maxilar y labial que coexpresan *vv1* y *sna* constituyen los primordios del *corpora allata* (CA) y la glándula protorácica (GP) respectivamente, mientras que las que coexpresan *vv1* y *trh* desde el segundo segmento torácico hasta el octavo segmento abdominal constituyen los primordios traqueales (sección publicaciones, artículo 1).

Vvl regula un subconjunto de genes esenciales para el desarrollo de la tráquea (Chung et al., 2011), tales como el receptor de la vía de señalización FGF, *breathless*, esencial para la ramificación los primordios traqueales (Anderson et al., 1996; Glazer and Shilo, 1991). En la tráquea, la expresión de *vv1* es mantenida a lo largo del desarrollo, a través de un *enhancer* autorregulador (*vv1-auto*) activado por *Ventral veinless* y *Trachealess* (Certel et al., 1996; Zelzer and Shilo, 2000). Para profundizar en la regulación espacio-temporal de *ventral veinless* (*vv1*), decidimos estudiar si el *enhancer* *vv1-auto* también se requiere en los primordios del *corpora allata* y la glándula protorácica.

Dado que la línea original no se mantiene, generamos un nuevo *reporter* donde clonamos el *enhancer* *vv1-auto* dirigiendo la expresión de mCherry (mat&met suplementarios). Nuestros resultados muestran que además de la expresión en oenocitos y tráquea descrita (Zelzer and Shilo, 2000), el *enhancer* autorregulador también se expresa en los precursores del *corpora allata* y la glándula protorácica (figura 1 D,G). La expresión de *vv1-auto* desaparece de la tráquea y los primordios de las glándulas en mutantes *Df(3)vv14* que deletiona el *enhancer* *vv1+2* pero mantiene la zona codificante y el resto de la zona reguladora de *vv1* (Fig. 2). Estos resultados sugieren que, al igual que en la tráquea, la regulación de la expresión de *vv1* en los primordios del *corpora allata* y la glándula protorácica consta de dos etapas. Una primera etapa donde los genes Hox activan la expresión de *ventral veinless* a través del *enhancer* *vv1+2* y una segunda etapa en la que la expresión de *ventral veinless* quedaría fijada a través del *enhancer* *vv1-auto* (figura 1 y 2). Sorprendentemente, la autorregulación de *vv1* en la maxila y el labio no ocurre en todas las células que expresan *vv1*, sino que se da exclusivamente en las células que activan *sna* sugiriendo la necesidad de un cofactor.

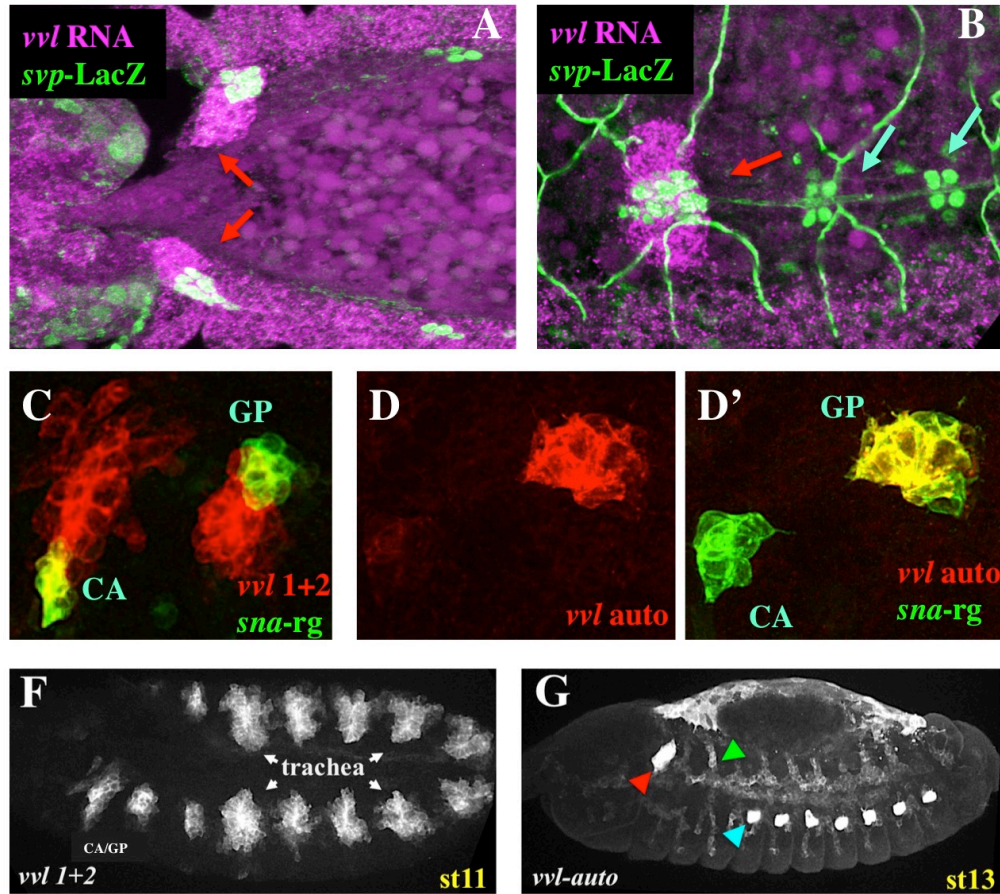


Figura 1. Dinámica de expresión de *ventral veinless* durante el desarrollo del CA/GP. (A-B) *in situ* fluorescente de *ventral veinless*, en un embrión *svp-lacZ* que marca los núcleos del CA. (A) La expresión de *vvl* se mantiene durante la fase de migración dorsal de los precursores endocrinos (CA/GP), así como una vez se ha formado la glándula anular (B). La flecha roja señala al primordio del CA/GP, y la azul a células cardíacas que también expresan *svp*. (C) Expresión del *enhancer vvl1+2* en los segmentos maxilar y labial, y del *enhancer snail-rg*, que define los primordios del *corpora allata* y la glándula protorácica en estadio 11. (D-D') En la maxila y el labio, el *enhancer vvl-auto* solo se activa en las células *ventral veinless* que expresan *snail*, si bien los niveles de activación son menores en el primordio del CA que en la GP. (F) Visión lateral del patrón de activación del *enhancer vvl1+2*, dirigiendo la expresión de mCherry de membrana en estadio 11. (G) Visión lateral del patrón de expresión del *enhancer vvl-auto*. La flecha roja, señala al primordio CA/GP migrando dorsalmente. El *enhancer vvl-auto* también se activa en la tráquea y los oenocitos (flechas verde y azul respectivamente).

A continuación, estudiamos si la proteína Vvl expresada a través de la activación del *enhancer* temprano *vvl1+2* es suficiente para que los primordios de ambas glándulas completen su migración. Para responder esta cuestión generamos un minigén en el que *ventral veinless* fusionado a eGFP se expresa bajo el control del *enhancer vvl1+2* (*vvl1+2-Vvl:eGFP*). Para estudiar su funcionalidad analizamos si este minigén es capaz de activar *vvl-auto-mCherry* en mutantes *ventral veinless*. En este contexto genético, donde la única fuente de *vvl* durante el desarrollo proviene del minigén (figura 3), observamos la expresión de mCherry dirigida por *vvl-auto* (figura 3) en tráqueas y glándulas (donde *vvl1+2* expresa Vvl-GFP); mientras que no observamos expresión de *vvl-auto* en los oenocitos ya que *vvl1+2* no expresa Vvl-GFP en estas células.

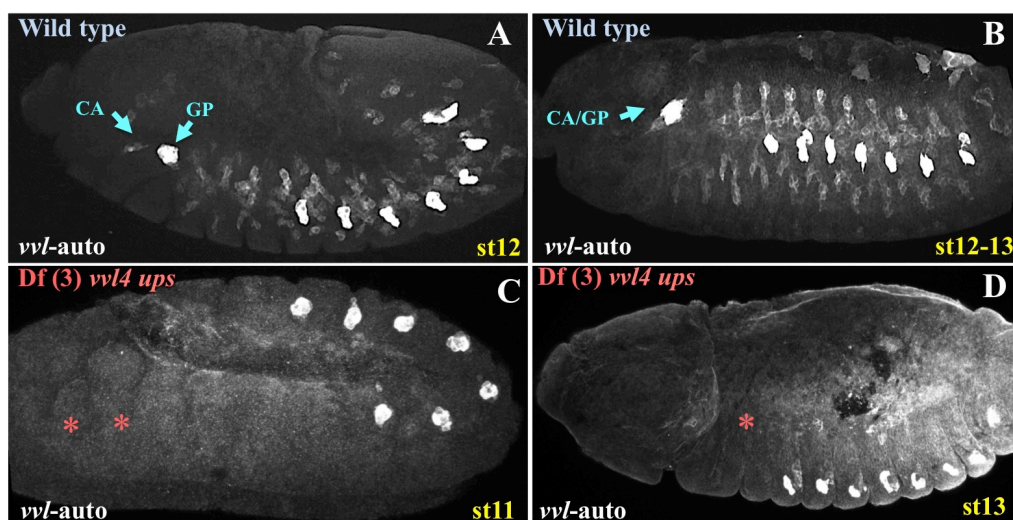


Figura 2. Expresión de *vvl-auto* en presencia o ausencia de *vvl1+2*. (A-B) En embriones silvestres el *enhancer* *vvl-auto* se expresa en los primordios del CA, la GP, la tráquea y los oenocitos. (C-D) En embriones homocigotos para la delección *Df(3)vvl4* (Sotillos et al., 2010) que elimina la región *upstream* que incluye los *enhancers* *vvl1+2* y *vvl 345* responsables de la expresión temprana de *vvl* en CA, GP y tráquea, el *enhancer* autorregulatorio de *vvl* no se activa en los primordios endocrinos ni en los respiratorios, indicando que la proteína Vvl expresada por los *enhancers* tempranos induce el mantenimiento de la expresión de *vvl* en estos órganos. Por el contrario, el *enhancer* *vvl-auto* se activa en oenocitos donde la expresión temprana de *vvl* se activaría por un *enhancer* no deletado en *Df(3)vvl4* (C-D).

Consistente con que la expresión temprana de *ventral veinless* es necesaria y suficiente para activar la migración dorsal del CA/GP, observamos que los defectos de la migración dorsal de mutantes *vvl*, se rescatan con la proteína Vvl:eGFP expresada a través del *enhancer* temprano *vvl1+2*, sin necesidad del *enhancer* autorregulador de la expresión de *vvl* durante la morfogénesis del CA y la GP (figura 3). También se puede observar (figura 3B), que esta fuente de proteína es suficiente para que los primordios traqueales completen la formación del árbol traqueal. Por otro lado, es destacable el hecho de que en la deficiencia *Df(3L)vvl4* que elimina los *enhancers* de *vvl* más tempranos que han sido identificados en la tráquea (Sotillos et al., 2010) existe migración de algunas ramas traqueales, lo que indica que existen otros *enhancers* que activarían la expresión de *vvl* en algunas subpoblaciones del primordio traqueal (figura 3). Recientemente se ha demostrado que *ventral veinless*, es necesario en la glándula protorácica para la activación de genes implicados en el metabolismo hormonal durante la vida larvaria de *D. melanogaster* (Cheng et al., 2014; Danielsen et al., 2014).

Parece plausible que *ventral veinless* pudiera tener una función temprana relacionada exclusivamente con la migración y morfogénesis de la glándula anular y, posteriormente, controlase su función metabólica. En el futuro sería interesante comprobar si tras el rescate de la migración dorsal del CA/GP con el minigen *vvl 1+2-Vvl:eGFP*, se activa y mantiene la expresión de genes como *phantom*, implicado en la síntesis de ecdisona en la glándula protorácica, y de otros genes involucrados en el metabolismo hormonal. La migración dorsal de los primordios del CA y la GP sin la activación de los genes codificantes para enzimas requeridas para la síntesis de hormonas, reforzaría la hipótesis de una función temporal dual de *vvl* en la organogénesis y la fisiología de la glándula anular.

2. Análisis genético y bioquímico de la regulación de los *enhancers* *vv1+2* y *snail-rg* por genes Hox

Los resultados presentados en la sección de publicaciones (artículo1), de esta tesis, demuestran el requerimiento de la ruta JAK/STAT y los genes Hox para la activación de *vv1+2* y *snail-rg*. La capacidad de múltiples genes para activar *vv1+2* representaría un caso de lo que se ha denominado regulación inespecífica de parálogo, ya que prácticamente cualquier proteína Hox podría regular *vv1+2* (Merabet and Mann, 2016). En contraste, la activación del *enhancer* *snail-rg*, representaría un ejemplo de regulación semi-específica de parálogo ya que sólo los dos Hox cefálicos más parecidos pueden activar su expresión (Merabet and Mann, 2016). En este apartado investigamos si las proteínas Hox regulan de manera directa los *enhancers* *vv1+2* y *snail-rg*, ya que no se conocen ejemplos de genes diana, cuya regulación por los genes Hox se ajuste a estas categorías y podrían servir como modelos de estudio de este tipo de regulación.

2.1 *Enhancer* *vv1+2*

2.1.1 Comprobación de unión directa mediante ChIP

En primer lugar, decidimos comprobar mediante la técnica de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) la capacidad de las proteínas Hox para unirse a la cromatina de *vv1+2* (Carey et al., 2009). Para simplificar, en lugar de analizar las seis proteínas Hox decidimos concentrarnos en la más anterior, el Hox cefálico *Dfd*, y la más posterior, *Abd-B*. Esto nos permite comparar la interacción con la cromatina de dos proteínas Hox con diferentes historias evolutivas y distinta afinidad por el DNA (Slattery et al., 2011).

Aunque el sistema óptimo para testar *in vivo* la regulación de las interacciones ADN-Proteína serían las células del *corpora allata* y la glándula protorácica del propio embrión, decidimos como primera aproximación experimental utilizar cultivos de células S2 de *Drosophila*, donde el aislamiento de poblaciones específicas de células, así como la cantidad de material, no suponen ninguna limitación. Para ello, transfectamos células S2 de *Drosophila melanogaster* con construcciones expresando *Dfd* y *Abd-B* fusionados al epítipo HA (hemaglutinina; material&métodos suplementarios).

Tanto en los ChIPs para *AbdB:HA* como para *Dfd:HA*, observamos un incremento significativo respecto a los controles, en la inmunoprecipitación de la región de la cromatina que abarca al *enhancer* *vv1+2* (Figura 4 y material&métodos suplementarios), demostrando que *Abd-B* y *Dfd*, a pesar de tener distintos sitios de reconocimiento al DNA, tienen la capacidad de unirse a este elemento *cis*-regulador en células S2 de *Drosophila*.

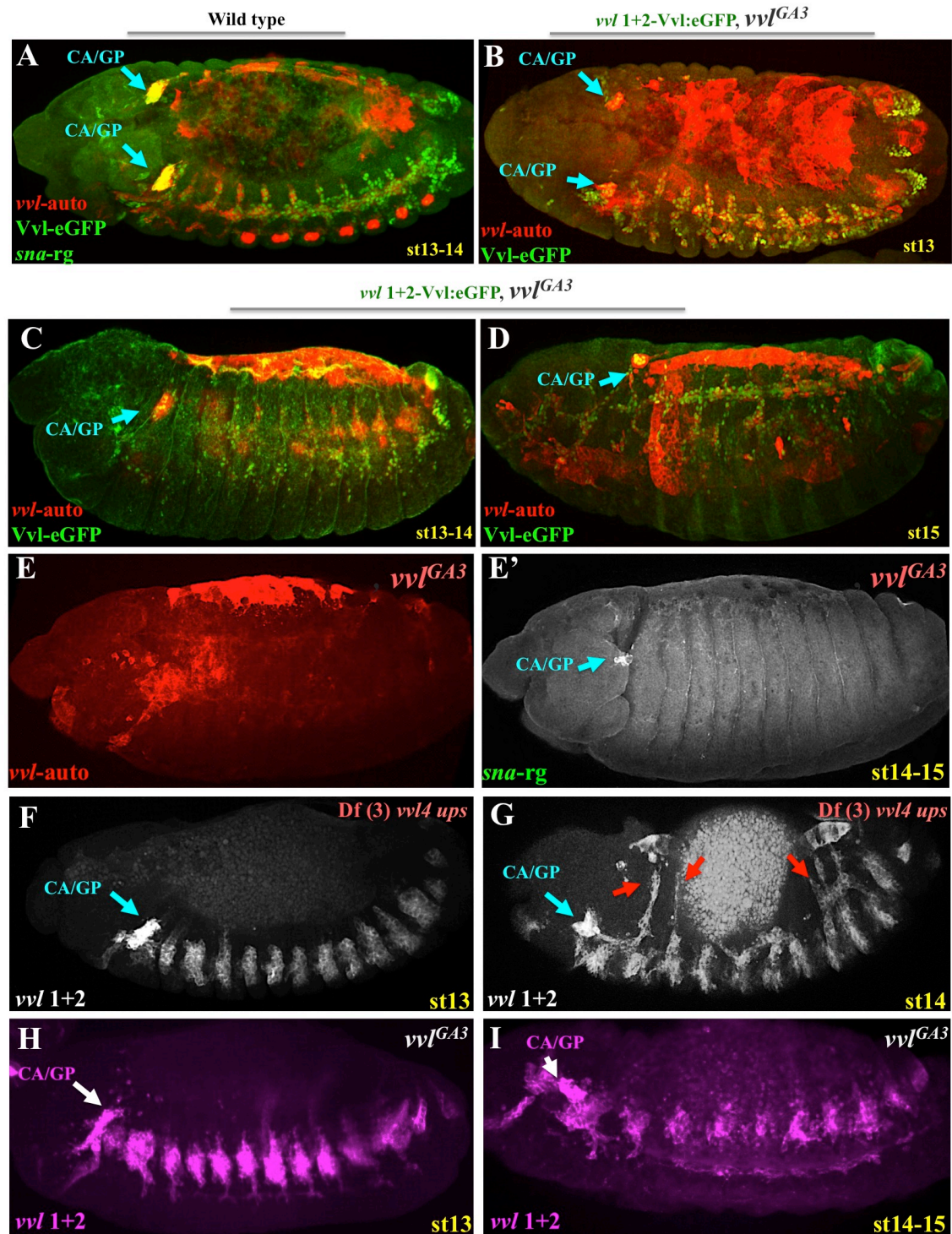


Figura 3. Rescate por el minigen *vvl*1+2-Vvl:eGFP de los defectos de migración en mutantes *vvl*. (A) Embrión *vvl*1+2-Vvl:eGFP *vvl*-auto-mCherry, mostrando la coexpresión del minigen en la CA/GP y tráquea, pero no en los oenocitos. (B-D) Mutante *vvl*, con rescate de la morfogénesis de la glándula anular mediante el minigén. Nótese la ausencia de activación del *enhancer* *vvl*-auto en los oenocitos. (E-E') Mutante *vvl* mostrando que el primordio del CA/GP no migra dorsalmente, experimenta una apoptosis parcial y no activa el *enhancer* *vvl*-auto. (F-G) La *Df*(3)*vvl4 upstream*, es similar a un mutante nulo de *vvl* (H-I) en cuanto a la ausencia de migración de los primordios del CA/GP, sin embargo, algunas ramas traqueales son capaces de migrar dorsalmente. Este hecho, supondría una evidencia adicional de que la proteína Vvl expresada a través del *enhancer* *vvl* 1+2, es la única fuente temprana de Vvl en los precursores endocrinos. (H-I) Mutante *vvl* nulo, donde existe una ausencia total de migración traqueal, así como de los precursores endocrinos.

Adicionalmente, analizamos los datos publicados de ChIP-Seq para la proteína Hox Ultrabithorax (figura 5), generados a partir de embriones de *Drosophila melanogaster* de diferentes estadios embrionarios (Choo et al., 2011). Existe una clara señal de inmunoprecipitación de la región genómica correspondiente al *enhancer* *vv1*+2. También el cofactor de proteínas Hox, Homothorax (Ryoo and Mann, 1999) se uniría a esta región. Comparativamente, no se detecta unión de Ubx al *enhancer* *vv1*+2 en estructuras adultas como la pata (Figura 5). Estos datos tienen la ventaja adicional de que han sido generados usando como material biológico el embrión de *Drosophila*.

2.1.2 Mutagénesis del *enhancer* *vv1* 1+2

Comprobada la unión de diferentes proteínas Hox a la cromatina del *enhancer*, decidimos estudiar cómo la mutación de sitios específicos de unión al DNA para diferentes proteínas Hox (material&métodos) afecta a la expresión de *vv1*+2.

Primero estudiamos *in silico* la secuencia del *enhancer* para identificar los posibles sitios de unión. El análisis bioinformático utilizando la base de datos JASPAR (http://jaspar.genereg.net/cgi-bin/jaspar_db.pl) nos permitió identificar la existencia de varios posibles sitios de unión para proteínas Hox. Cabe destacar que, algunos de estos son sitios de alta afinidad *in vitro* para proteínas Hox en complejo con su principal cofactor, *Extradenticle* (Slattery et al., 2011).

En un estudio previo, el *enhancer* *vv1*+2 fue subdividido en tres fragmentos: miniS1, miniS2 y miniS3 (Figura 6 A-B) observándose que miniS1 y miniS3 no dirigen ninguna expresión, siendo miniS2 el único fragmento con capacidad para dirigir la expresión en todos los segmentos, a excepción del segmento labial (Sotillos et al., 2010). Por esta razón, realizamos las primeras mutagénesis sobre el fragmento *vv1* miniS2, por ser el elemento de menor tamaño capaz de dirigir expresión (figuras 6 y 7).

Identificamos en *vv1* miniS2 una secuencia (Hox1/Exd; Figura 6) predicha como sitio de unión de elevada afinidad para todos los genes Hox en complejo con el cofactor *Extradenticle* (Exd). Si bien, la secuencia central de 8 pares de bases permitiría unir con una elevada afinidad proteínas Hox posteriores (Antp, Ubx, Abd-A, Abd-B), en complejo con Exd, ésta secuencia sería la óptima para alcanzar el máximo grado de unión *in vitro* para los genes Hox anteriores *Deformed* y *Sex Combs Reduced* (Slattery et al., 2011).

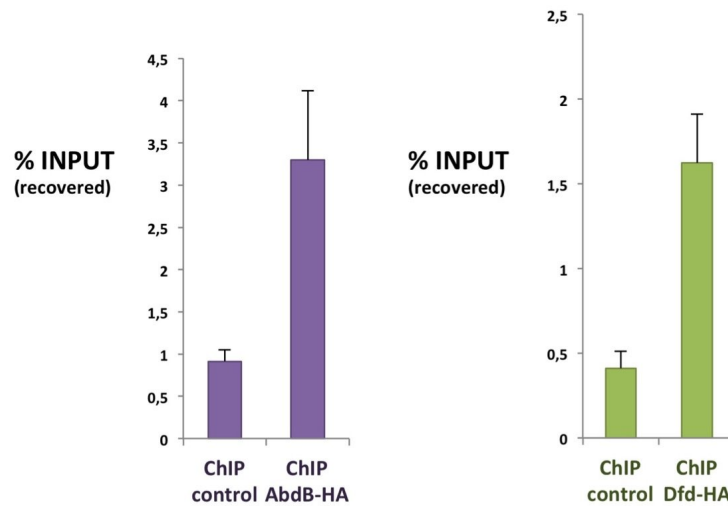


Figura 4. ChIP-PCR del *enhancer vv1+2* en cultivo de células S2. Tras expresar en células S2 las proteínas AbdB:HA o Dfd:HA, inmunoprecipitamos la cromatina con anticuerpo anti-HA y se amplificó por PCR usando dos cebadores específicos del elemento *cis*-regulador *vv1+2*. Tanto con AbdB:HA, como con Dfd:HA, se incrementó de manera significativa la cromatina inmunoprecipitada correspondiente a la región genómica que abarca *vv1+2* (porcentaje de *input* o cromatina total inmunoprecipitada; material y métodos).

Debido a la presencia del sitio de unión Hox1/Exd, como potencial sitio de interacción entre el *enhancer vv1+2* y las proteínas Hox en complejo con Exd, decidimos en primer lugar confirmar genéticamente el requerimiento de Exd para su activación. Para ello estudiamos mutantes nulos para Homothorax, una proteína requerida para el transporte de Exd al núcleo, y que por tanto genera una falta de función de Exd. El resultado fue una fuerte reducción de la expresión del *enhancer* en el labio y la maxila, donde se expresan *Dfd* y *Scr* (Figura 7B).

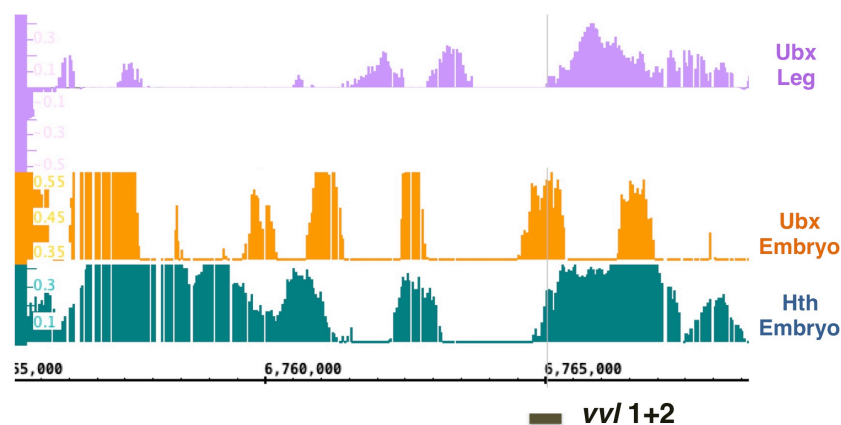


Figura 5. ChIP-Seq de la *region upstream* del gen *vv1*. Se muestran los perfiles de inmunoprecipitación de la cromatina para la proteína Ubx obtenidos por (Choo, S.W et al., 2011), en la pata o en embriones de *Drosophila* (varios estadios). Se puede apreciar claramente la unión de Ubx al elemento *cis*-regulador *vv1+2* en células embrionarias, en contraste a células procedentes de la pata. El cofactor de proteínas Hox, Hth, también se une a nivel del *enhancer vv1+2* en el embrión. Los gráficos fueron generados con el programa informático *Integrated Genome Browser* 9.0.

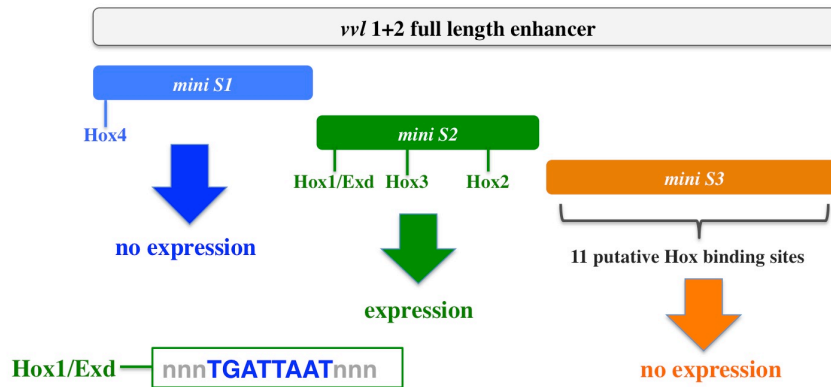


Figura 6. Esquema del *enhancer vvl1+2*, subdivisiones y sitios de unión para proteínas Hox. Subdivisión del *enhancer vvl1+2* (680 pb) en tres fragmentos *miniS1* (209 pb), *miniS2* (209 pb) y *miniS3* (262 pb), de los cuales solo *miniS2* tiene capacidad para dirigir expresión (Sotillos et al; 2010). Se representan a su vez los sitios de unión para proteínas Hox predichos con la base de datos JASPAR. La secuencia central del sitio de unión Hox1, ha sido caracterizada bioquímicamente como un sitio de alta afinidad para proteínas Hox en complejo con Exd (Slattery et.al; 2011).

En el resto de segmentos troncales se observa también una reducción en menor grado, a excepción del dominio de expresión de Abd-B en el octavo segmento abdominal donde no se observa una reducción de la expresión del *enhancer* (Figura 7). Este resultado sugiere que los genes Hox anteriores muestran una elevada dependencia de Exd/Hth para la activación del *vvl1+2*, mientras que Antp, Ubx y Abd-A, aún requiriendo Exd para una activación óptima, podrían regular el *enhancer* en ausencia de Exd, mientras que Abd-B sería independiente de Exd/Hth para activar *vvl1+2*.

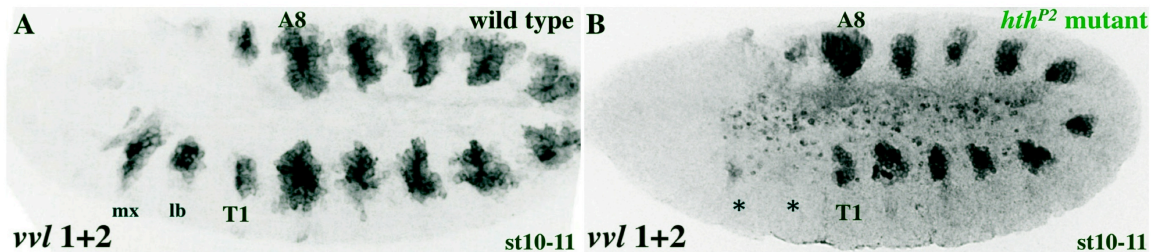


Figura 7. Expresión de *vvl1+2* en mutantes *homothorax*. Patrón de expresión de *vvl1+2* en un embrión silvestre (A) y en un embrión mutante nulo para *hth* (B) donde no existiría actividad de Exd al impedirse su transporte al núcleo mediado por Hth. Se observa una fuerte reducción de la expresión en la maxila y labio (asteriscos), y una reducción menor en los primordios traqueales, a excepción del primordio traqueal en A8 donde Abd-B es expresado a elevados niveles.

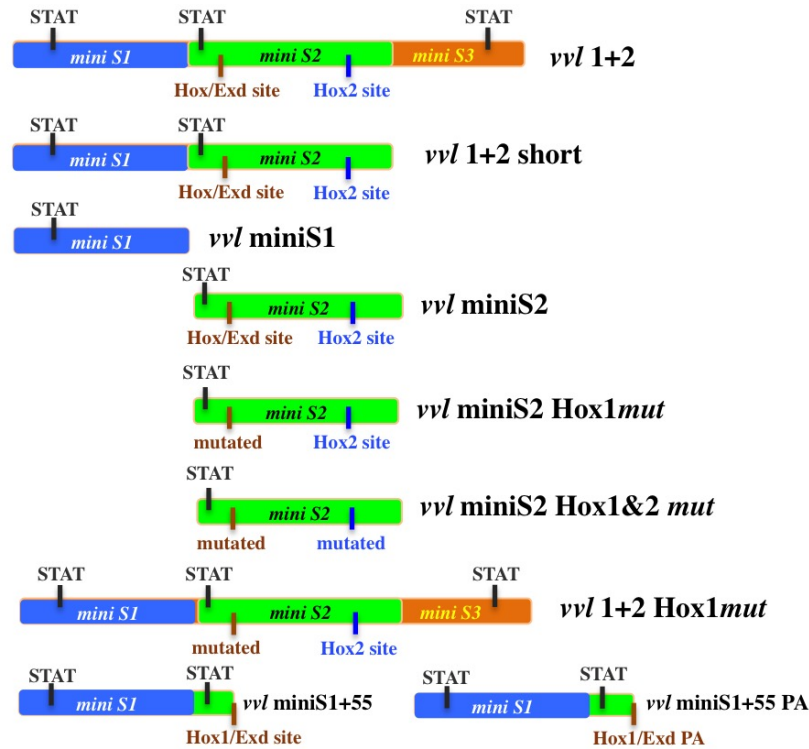


Figura 8. Mutagénesis del enhancer *vvl1+2*. Esquema de las diferentes subdivisiones y versiones mutadas del enhancer *vvl1+2*. En esta figura se han destacado solamente los sitios de unión Hox1/Exd y Hox2 del fragmento *miniS2*, así como todos los sitios para el factor de transcripción STAT92E. Las nuevas subdivisiones y versiones mutantes del enhancer *vvl1+2* generadas en este trabajo fueron: *vvlminiS2 Hox1mut*, *vvlminiS2 Hox1&2mut*, *vvl1+2 Hox1mut*, *vvlminiS1+55* y *vvlminiS1+55PA*. Cabe destacar, que el enhancer *vvl1+2 short*, el cual no incorpora la región *vvlminiS3*, presenta un patrón de expresión igual al enhancer *vvl1+2* (no mostrado), si bien no es descartable que la región *vvlminiS3*, pueda unir también proteínas Hox ya que tiene una elevada presencia de posibles sitios de unión para proteínas Hox (*JASPAR database*; véase figura 6).

A continuación, analizamos el efecto de mutar el sitio Hox1/Exd en el enhancer *vvl1+2* original (*vvl 1+2 Hox1mut*). En este contexto, la actividad del enhancer no desaparece de los segmentos torácicos y abdominales, aunque está muy reducida en los segmentos maxilar y labial (figura 9F). Esto sugiere que en el enhancer *vvl1+2* otros sitios Hox pueden compensar la falta del sitio Hox1/Exd.

El patrón de expresión de *vvl1+2 Hox1mut* es similar al del enhancer *vvl1+2* en embriones mutantes para *hth* (figura 7), especialmente en términos de elevada reducción de la expresión en los segmentos cefálicos, confirmando que los genes Hox anteriores *Dfd* y *Scr*, presentarían un mayor requerimiento de los cofactores Hth/Exd que los genes Hox troncales para la regulación del enhancer *vvl1+2*. Por otro lado, en el enhancer *vvl1+2 Hox1mut*, los genes Hox troncales podrían activar la expresión del enhancer mediante la interacción con otros sitios de unión.

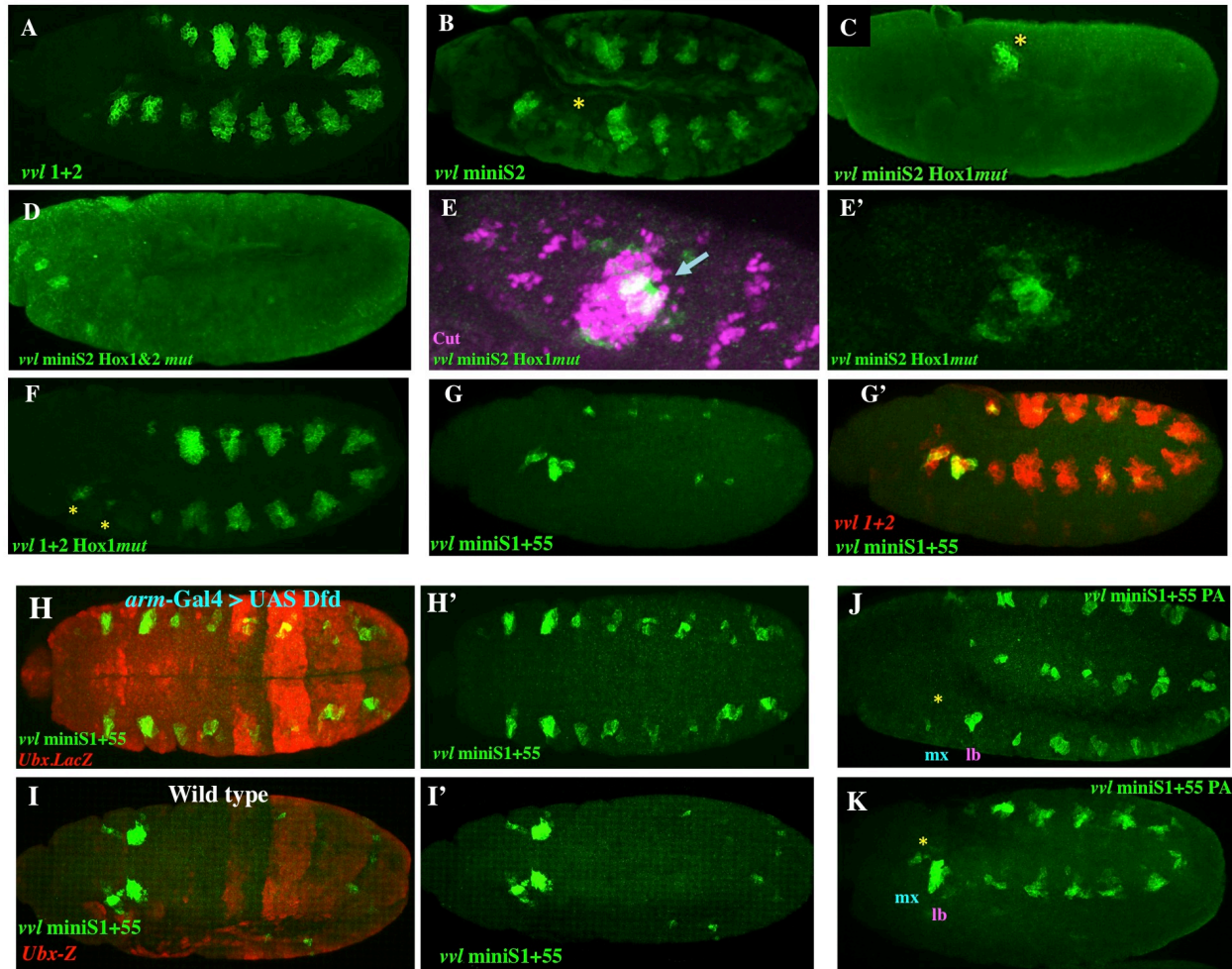


Figura 9. Expresión embrionaria de construcciones derivadas del enhancer *vv1+2*. (A) Patrón de expresión, silvestre de *vv1+2*. (B) El fragmento *vv1 miniS2* presenta actividad en los segmentos posteriores y el maxilar, mostrando reducidos niveles de expresión en el labio y T1 (asterisco). (C) La mutación del sitio Hox1/Exd reduce drásticamente la actividad del enhancer en el segmento maxilar y en los primordios traqueales. (D) En *vv1 miniS2 Hox1&2mut* la mutación adicional del sitio Hox2 elimina la expresión en A8. (E-E') Expresión de Cut en células del espiráculo. La flecha señala a una zona de transición entre espiráculo y tráquea. (F) En *vv1+2 Hox1mut* la mutación del sitio Hox1/Exd, en el contexto del fragmento original *vv1+2*, reduce la expresión del enhancer en la región cefálica sin afectar la expresión en los segmentos troncales. (G) La extensión del fragmento *vv1 miniS1* para incluir el sitio Hox1/Exd, *vv1 miniS1+55*, incrementa la expresión en los segmentos cefálicos. Como se puede comprobar en la doble tinción con *vv1+2-mCherry* (G') los niveles cefálicos son muy parecidos al enhancer *vv1+2*, mientras que la expresión a lo largo del tronco es muy reducida. (H-H') Vista ventral de un embrión *vv1 miniS1+55* con expresión ectópica de Dfd a lo largo del ectodermo mostrando un incremento de la señal del enhancer *vv1 miniS1+55* en el tronco con respecto al control (I-I'; vista ventral). (J-K) En un mutante *vv1 miniS1+55PA*, donde el sitio Hox1/Exd se ha mutado para incrementar su afinidad de unión por los genes Hox posteriores, se incrementa la actividad del enhancer en los segmentos torácicos y abdominales, reduciéndose en el segmento maxilar (asterisco).

Para profundizar en la importancia que el sitio Hox1/Exd tiene para la regulación del enhancer, decidimos expandir la región *vv1 miniS1*, la cual no presenta actividad enhancer por sí misma, añadiéndole los 55 pares de bases adyacentes de la región *miniS2* para incorporar el sitio Hox1/Exd, generando el enhancer *vv1 miniS1+55* (también incluiría un segundo sitio STAT92E; figura 7).

Sorprendentemente, el *enhancer* *vv/* miniS1+55, es activo a niveles casi normales en los segmentos maxilar y labial, mostrando niveles de expresión residuales en los segmentos torácicos y abdominales (figura 9G). Estos resultados muestran que, aunque Hox1/Exd puede ser utilizado por genes Hox del tronco, no es suficiente para la actividad en estos segmentos, indicando que tal vez sea activo en el fragmento *vv/* miniS2 en interacción con otros sitios de unión como Hox2.

Para estudiar si la expresión de *vv/* miniS1+55 se debe a los Hox cefálicos, sobreexpresamos *Dfd* a lo largo de todo el tronco y observamos un incremento de la señal de *vv/* miniS1+55 en segmentos torácicos y abdominales (Figura 9H-H'). El mismo resultado fue obtenido al inducir la expresión ectópica de *Scr* en el ectodermo (no mostrado). Estos resultados sugieren que *Dfd* y *Scr* tienen mayor afinidad de unión al sitio Hox1/Exd que el resto de genes Hox posteriores, independientemente de la contribución de la región *vv/* miniS1 a la actividad *enhancer*.

Finalmente, para investigar la posible regulación genética de diferentes genes Hox sobre el mismo elemento *cis*-regulador a través de la incorporación de sitios de unión de diferente afinidad, modificamos la afinidad Hox-anterior del sitio Hox1/Exd, hacia Hox-Posterior, en base a los datos publicados de afinidad *in vitro* (Slattery et al., 2011). Se introdujo un único cambio de una base en la secuencia central del sitio Hox1/Exd sin modificar las secuencias flanqueantes, para transformarlo en un sitio canónico de máxima afinidad para Hox posteriores (*PA-Posterior Affinity*). El resultado fue un incremento de la expresión del *enhancer* *vv/* miniS1+55PA en los segmentos troncales observándose un patrón segmentalmente repetido donde, además, los niveles de activación en el dominio de expresión de *Dfd* se muestran reducidos (Figura 9J-K). Esto último sería esperable ya que la secuencia central no es la óptima en términos de afinidad para *Dfd* y, con las mismas secuencias flanqueantes, la afinidad de unión puede reducirse. De tal manera que, incluso cuando se ha eliminado aproximadamente el 61% de la secuencia del *enhancer* original, el fragmento *vv/* miniS1+55 PA puede dirigir la expresión en todos los segmentos mediante un incremento de la afinidad de unión por Hox troncales al sitio Hox1/Exd.

2.1.3 Análisis bioquímico del *enhancer* *vv/*1+2

En base a los datos genéticos presentados en la sección publicaciones (artículo 1) sobre la regulación genética de *vv/*1+2 por genes Hox y los datos preliminares presentados en el apartado anterior, hemos establecido recientemente una colaboración con los laboratorios del Dr. Richard Mann (Columbia University), especializado en el análisis bioquímico de *enhancers* y Harmen Bussemaker (Columbia University) especializado en el análisis bioinformático de las interacciones ADN-Proteína. Esta colaboración se encuentra activa en el momento de escribir esta tesis. A continuación, presentaré un conjunto de resultados bioquímicos en relación con el sitio Hox1/Exd del *enhancer* *vv/*1+2, generados durante una estancia en el laboratorio del Dr Richard Mann durante el último trimestre de 2016.

En primer lugar, se procedió a aplicar un conjunto de algoritmos matemáticos sobre el *enhancer* de *vv/1+2*, basados principalmente en datos recientes de Selex-Seq para Dfd, Scr, Antp y Ubx, en complejo con Exd (Slattery et al., 2011), desarrollados en el laboratorio del Dr Bussemaker con el objetivo de predecir *in silico* sitios de unión para proteínas Hox en complejo con Exd.

El sitio inicialmente identificado en el apartado anterior como Hox1/Exd de *vv/1+2*, apareció predicho como el sitio con mayor afinidad por heterodímeros Hox/Exd tanto para Dfd, Scr, Antp y Ubx. Los análisis predijeron otro sitio de unión Hox/Exd de alta afinidad para todos los genes Hox en la region miniS3. Adicionalmente, se identificaron un elevado número de sitios de unión monoméricos, esto es, que no requieren al cofactor Exd, para Ubx, en *vv/miniS1*, *vv/miniS2* y especialmente en *vv/miniS3*, que en su mayoría no fueron detectados en nuestro análisis con la base de datos JASPAR.

A continuación, se procedió a realizar un Ensayo de Movilidad Electroforética (*Electroforetic Mobility Shift Assay*, EMSA; material y métodos), para testar la capacidad de unión *in vitro* al sitio Hox1/Exd de Ubx y Dfd como ejemplos de proteína Hox posterior (figura 10) y anterior (Figuras 11 y 12).

Se detectó unión a la sonda silvestre de Ubx en complejo con Exd, así como en forma de homodímero y monómero. La sonda que porta la misma mutación testada *in vivo* en la secuencia Hox/Exd central, elimina la unión de Ubx en complejo con Exd. Mientras que la sonda con el cambio de afinidad que convierte la secuencia Hox/Exd central en la óptima para la unión de Hox posteriores, incrementó la capacidad de de Ubx en complejo con Exd para unirse a la sonda (Figura 10). Estos datos se correlacionan perfectamente con las observaciones realizadas *in vivo*, donde se observa una expansión de la activación del *enhancer vv/miniS1+55 PA*, a lo largo del tronco (figura 9).

En el caso de Dfd, se detectó unión a la sonda silvestre en complejo con Exd, así como elevados niveles de unión como monomero. La sonda mutante pierde la unión como heterodímero (Hox/Exd), mientras que la unión como monómero se mantiene. La versión de la sonda con mayor afinidad por Hox posteriores presenta altos niveles de unión, reduciéndose también en este caso la unión de Dfd como monómero (Figura 11). Sin embargo, si se comparan los carriles con menor concentración de Dfd, para la sonda silvestre y con cambio de afinidad, parece apreciarse una menor unión de Dfd como heterodímero en el caso de la sonda con cambio de afinidad (Figura 11).

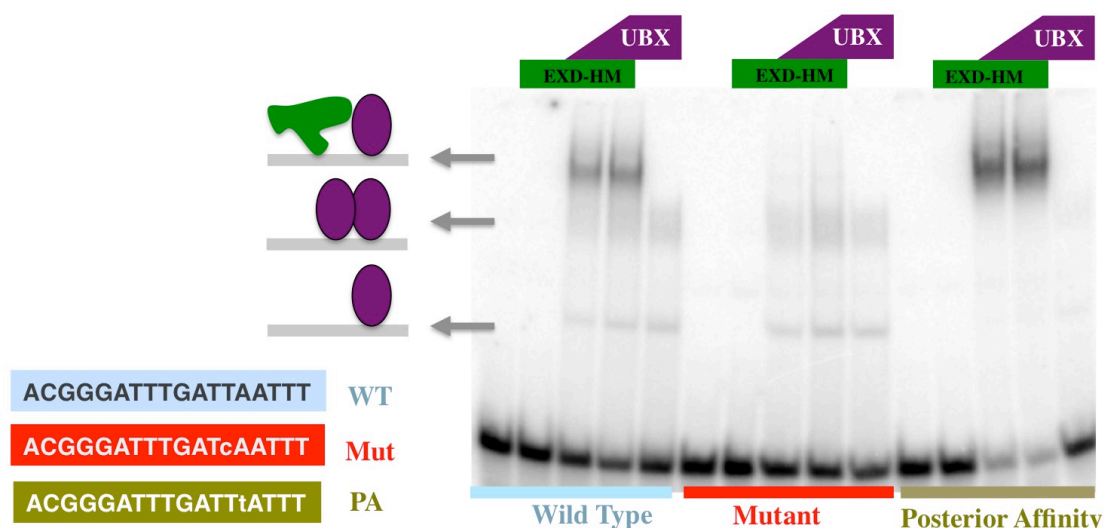


Figura 10. Interacción *in vitro* entre Ubx y el sitio de unión Hox1/Exd de *vv1+2*. Se analizó en un mismo gel, la unión de Ubx a la sonda silvestre (WT), mutante (Mut) y con incremento de afinidad a Hox posterior (*Posterior Affinity*, PA), correspondientes al sitio de unión Hox1/Exd. Se utilizó la misma concentración de Exd en todos los casos y dos concentraciones de Ubx.

En la sonda silvestre se detectan altos niveles de unión para el complejo Ubx-Exd. Esta unión es eliminada en la versión mutante de la sonda, mientras que el cambio que convierte la secuencia central (8 pb) en la óptima para la unión de proteínas Hox posteriores, aumenta la unión de Ubx en complejo con Exd, disminuyendo la unión como homodímero y monómero. Este aumento de la unión ADN-Proteína se evidencia también en la menor cantidad de sonda libre (bandas inferiores). No se observa ninguna banda tanto en los carriles que contienen la sonda libre o únicamente Exd.

Para visualizar más claramente esta diferencia de unión, así como tratar de discernir si Dfd se une preferente como heterodímero o como monómero a la sonda silvestre, realizamos otro EMSA disminuyendo la concentración de Dfd (Figura 12). En este caso se puede observar que Dfd se une preferentemente como heterodímero a la sonda silvestre y con cambio de afinidad, presentando una mayor afinidad por la sonda silvestre (Figura 12). Esto correlaciona con la observación *in vivo* para el fragmento *vv1* miniS1+55 PA, donde los niveles de activación se reducen en la maxila en comparación con el fragmento silvestre, *vv1* miniS1+55 (Figura 9).

2.2 Enhancer *snail-rg*

En la sección publicaciones (artículo 1) mostramos que la activación del enhancer, *snail-rg*, que dirige expresión en los primordios del *corpora allata* y la glándula protorácica, requiere únicamente los genes Hox anteriores Dfd y Scr (requiriéndose también la vía JAK/STAT), por lo que la investigación de la activación directa por Dfd y Scr constituye un buen ejemplo de regulación semi-específica de parálogo, contrapuesta al enhancer *vv1+2*, que es activado por 6 genes Hox en una regulación inespecífica de parálogo (Merabet and Mann, 2016).

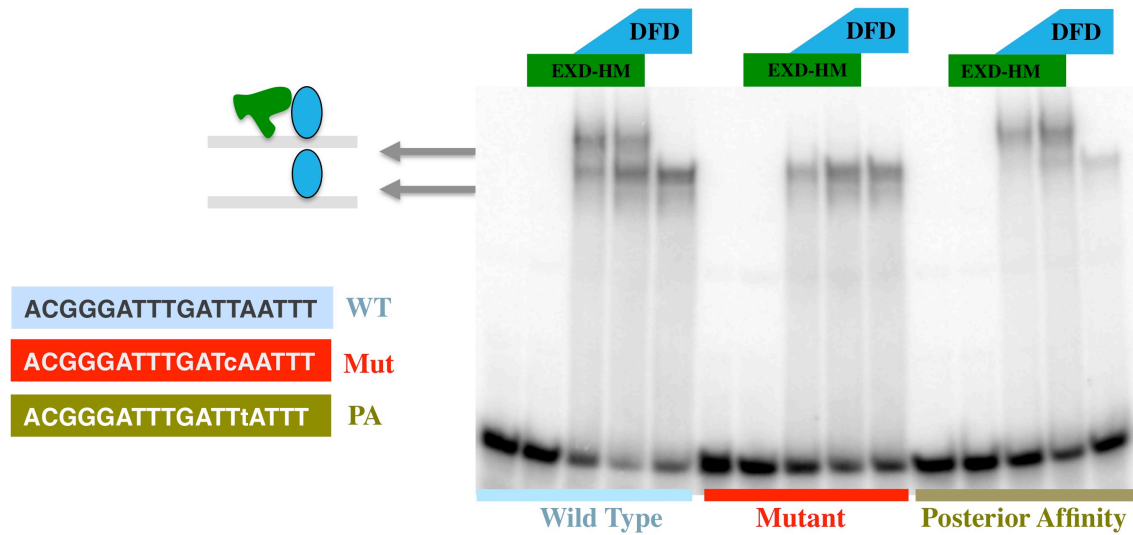


Figura 11. Interacción *in vitro* entre Dfd y el sitio Hox1/Exd de *vv1+2*. Se analizó en un mismo gel, la unión de Dfd a la sonda silvestre (WT), mutante (Mut) y con incremento de afinidad posterior (PA), correspondientes al sitio de unión Hox1/Exd del *enhancer vv1+2*. Se utilizó la misma concentración de Exd en todos los casos y dos concentraciones de Dfd.

En la sonda silvestre se detectan altos niveles de unión para el complejo Dfd-Exd, así como altos niveles de Dfd unido monoméricamente. La unión como heterodímero es eliminada en la versión mutante de la sonda, mientras que el cambio que optimiza la secuencia central (8 pb) para la unión de proteínas Hox posteriores, reduce la unión de Dfd como monómero y también parece reducir la unión en complejo con Exd, si se comparan los carriles con menor concentración de Dfd para la sonda WT y PA.

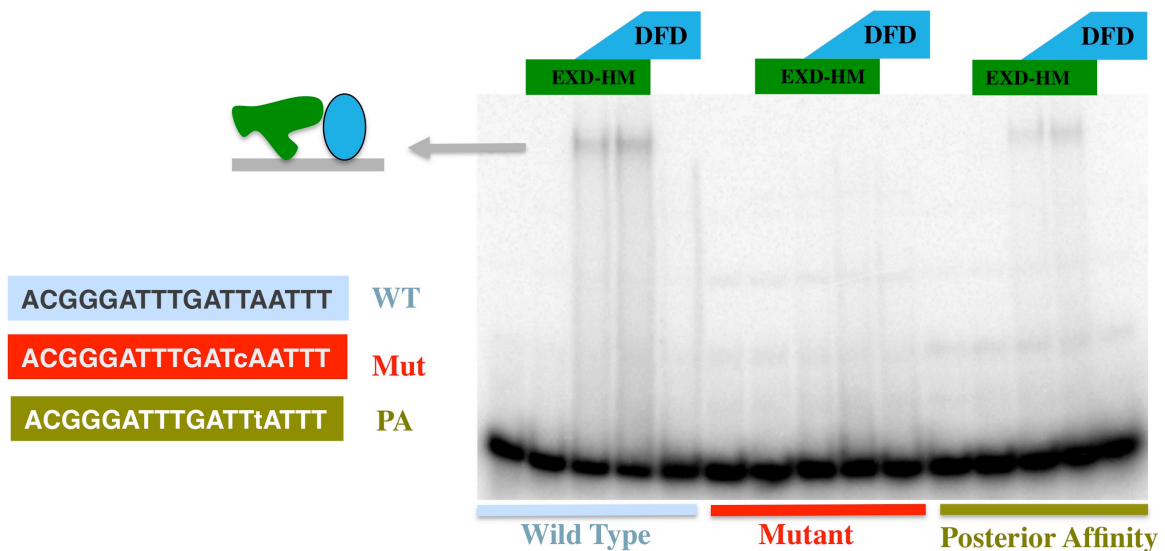


Figura 12. Interacción *in vitro* entre bajos niveles de Dfd y el sitio Hox1/Exd. Se procedió a reducir la cantidad de Dfd utilizada *in vitro*, para ver su preferencia de unión por las diferentes sondas. A baja concentración se observa la unión preferente de Dfd como heterodímero, así como unos mayores niveles de unión o afinidad por la sonda silvestre.

El *enhancer snail-rg* tiene una longitud de 1.9 kb. Para facilitar su estudio, procedimos a subdividir el *enhancer* hasta lograr el mínimo fragmento que reprodujera el patrón de expresión. El fragmento *sna-R2* de 1.2 kb presenta un patrón de expresión similar en los primordios endocrinos (figura 13). Una nueva subdivisión de 681 pares de bases, *sna-rg R2P2*, hasta el primer sitio de unión para el factor de transcripción STAT92E muestra un patrón de expresión similar al fragmento original por lo que en adelante, se continuó trabajando sobre *sna-R2P2* (Figuras 13,15,16).

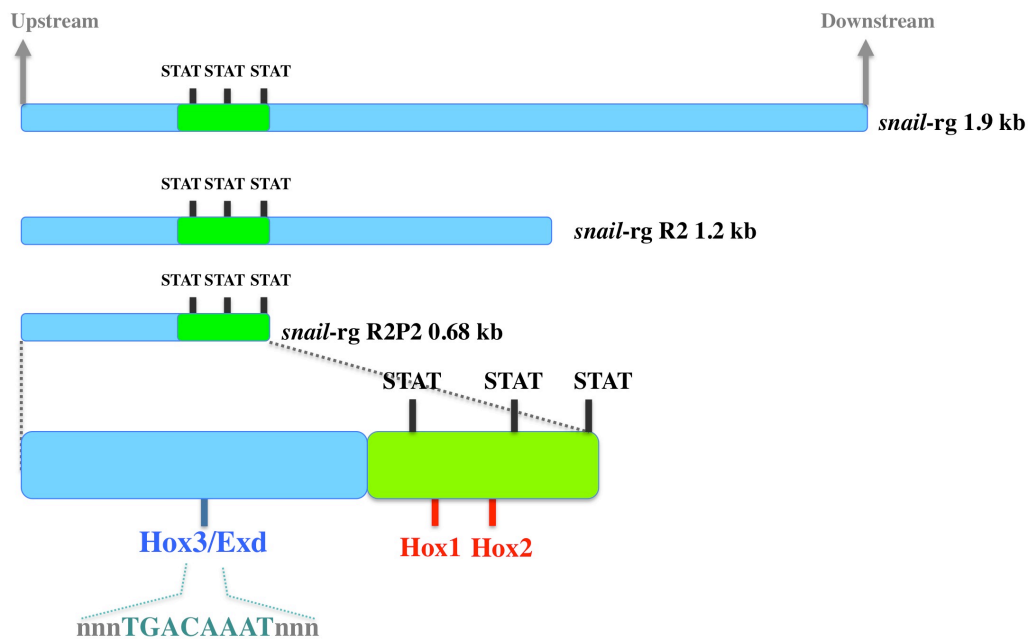


Figura 13. Subdivisión del *enhancer snail-rg* y posibles sitios de unión a proteínas Hox y STAT92E. Obtuvimos el fragmento *sna-rg* R2P2 de 681 pares de bases cuyo límite coincide con un sitio de unión para STAT92E. Se representa el fragmento que contiene tres sitios de unión para STAT92E en color verde. Se destacan en el fragmento *sna-rg* R2P2 únicamente tres sitios de unión para genes Hox, de un total de 9 predichos con la base de datos JASPAR, debido a que han sido hasta el momento los únicos sitios analizados genética o bioquímicamente y, además, son también predichos por el algoritmo del Dr Bussemaker como los sitios de unión para genes Hox más relevantes. Destaca el sitio Hox3/Exd, que coincide con un sitio de unión de alta especificidad para Dfd y Scr en complejo con Exd, pero que sin embargo, presenta una menor afinidad *in vitro* en comparación con otros sitios de unión canónicos tales como el sitio Hox1/Exd en *vv1+2* (Slattery et al., 2011; figura 4 introducción). La alta especificidad para Dfd y Scr en complejo con Exd, viene dada por una afinidad relativa muy baja para proteínas Hox troncales como Antp o Ubx cuando forman un heterodímero con Exd, no interaccionando preferentemente con dicha secuencia, *in vitro* (Slattery et al., 2011; figuras 4-5 introducción).

2.2.1 Mutagénesis del *enhancer snail-rg* R2P2

El análisis del *enhancer sna-rg* R2P2 mediante JASPAR reveló una región (destacada en color verde figura 13) que contiene tres sitios de unión a STAT92E, e incluye también dos sitios predichos para Dfd y Scr. Así mismo, identificó un sitio denominado Hox3/Exd (Figura 13) fuera del módulo STAT92E, que coincide con una secuencia central para el heterodímero Hox/Exd que interaccionaría preferentemente con las proteínas Hox anteriores Dfd y Scr (Slattery et al., 2011).

Para estudiar el posible requerimiento de Exd/Hth en la activación del *enhancer*, analizamos la expresión del *enhancer snail-rg* en un fondo mutante *homothorax*. El resultado fue una fuerte reducción en la activación, sugiriendo que la regulación por Dfd y Scr requiere a los cofactores Exd/Hth (Figura 14).

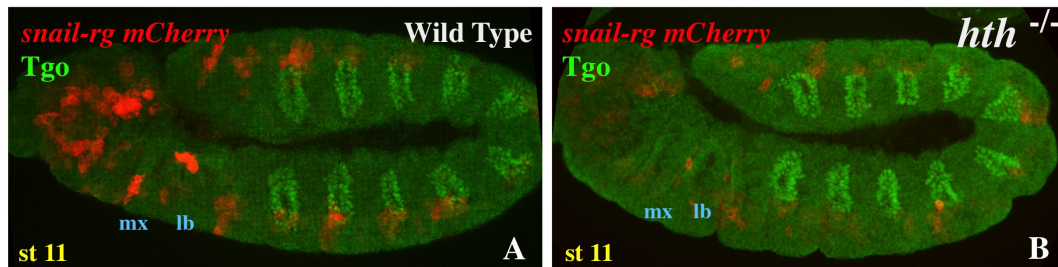


Figura 14. Requerimiento de Homothorax para la activación de *snail-rg*. (A) Embrión silvestre, donde el *enhancer snail-rg* dirige la expresión de mCherry y con las tráqueas marcadas en verde con Tgo. (B) En un mutante *homothorax* (*hth*^{P2}) la activación del *enhancer snail-rg* disminuye en los segmentos maxilar y labial.

Hemos mostrado (sección publicaciones, artículo1) que la falta de función de la vía JAK/STAT conlleva una fuerte disminución de la activación del *enhancer snail-rg* tanto en el *corpora allata* como en la glándula protorácica. Para comprobar si la regulación por STAT92E es directa, mutamos los tres sitios de unión a STAT92E. Esta mutación elimina la expresión del *enhancer snail-rg* R2P2 en el segmento labial pero, sorprendentemente, no en el maxilar (figura 15). Esto sugiere el requerimiento directo de STAT92E para la activación de *snail* en el primordio de la glándula protorácica y su requerimiento indirecto en el primordio del *corpora allata* (Figura 15). Por otro lado, cabe destacar que la construcción, *sna-rg* R2P2 STAT92Emut, en adelante denominado *sna-rg* CA, proporciona una interesante herramienta genética para marcar y expresar moléculas específicamente en el CA. Por ejemplo, el *enhancer sna-rg* CA permitiría expresar inductores de la muerte celular específicamente en el primordio del *corpora allata* para estudiar los efectos fisiológicos de la falta de función de dicha glándula desde el final del desarrollo embrionario, lo cual no se ha conseguido hasta el momento.

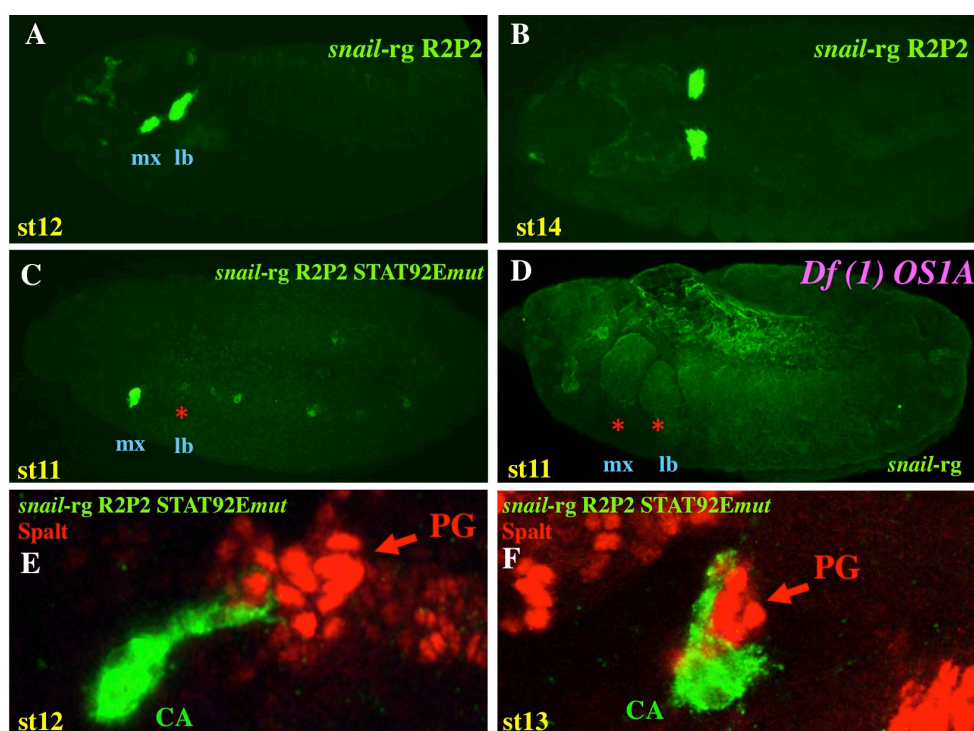


Figura 15. Expresión del enhancer *snail*-R2P2 y mutagénesis de los sitios de unión STAT92E. (A-B) Vista lateral y dorsal de embriones expresando el enhancer *snail*-R2P2 en los primordios del CA y la GP en distintos estados de desarrollo. (C) La mutación de los tres sitios de unión STAT92E en el enhancer *snail*-R2P2 (*sna*-R2P2 STAT92Emut = *sna*-rg CA), elimina la activación del enhancer en el primordio de la PG en el segmento labial. (D) En un embrión *Df(1)os1A*, que elimina los tres ligandos de la ruta JAK-STAT en *D.melanogaster*, la activación de *snail*-rg está reducida en la maxila y el labio. (E-F) Muestra la glándula protorácica marcada con anti-Spalt y el CA con el enhancer *sna*-R2P2 STAT92Emut.

Por otro lado, mutamos los sitios Hox1 y Hox2, localizados en el módulo STAT92E generando el enhancer *sna*-R2P2 Hox1&2mut. El resultado de mutar ambos sitios, fue una ligera reducción de los niveles de expresión tanto en el primordio de la maxila como en el del labio. Esta disminución se visualiza al combinar el fragmento mutado *sna*-R2P2 Hox1&2mut expresando eGFP, con el fragmento *sna*-rg expresando mCherry (figura 16B). Este resultado sugiere el requerimiento de otros sitios Hox de unión al enhancer. En el momento de escribir esta tesis, no se ha mutado cada sitio de unión individualmente ni el tercer sitio Hox3/Exd.

2.2.2 Análisis bioquímico del enhancer *snail*-rg R2P2

La relevancia del sitio Hox3/Exd fue analizada *in vitro*, así como la del sitio Hox1, durante la estancia en el laboratorio del Dr Richard Mann.

El sitio Hox1 fue identificado por el algoritmo del Dr Bussemaker, como un sitio de unión Hox para Dfd y Scr en complejo con Exd, así como para Ubx/Antp con valores de afinidad muy similares. En el caso de Dfd y Scr la afinidad de unión al sitio Hox1 como heterodímero es menor que para el sitio Hox3/Exd. El algoritmo del Dr Bussemaker no identifica el Hox2 como un sitio de unión de proteínas Hox en complejo con Exd.

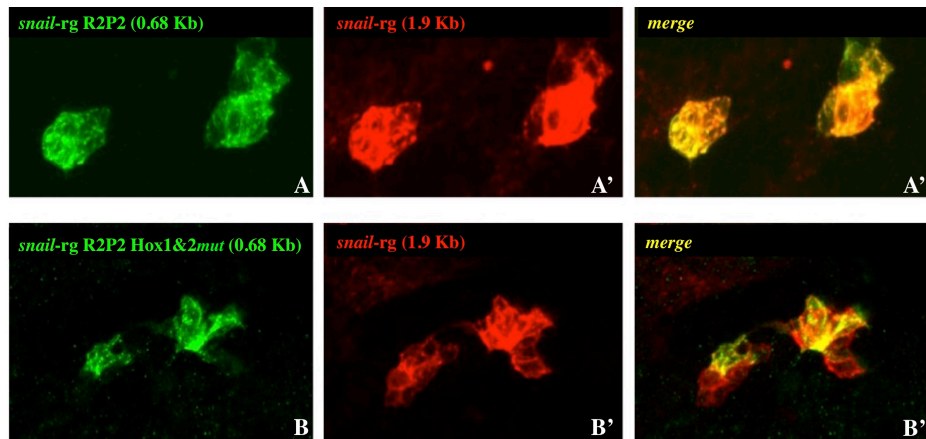


Figura 16. Expresión del enhancer *sna*-R2P2 Hox1&2mut. (A-A'') El fragmento de 0.68 kb, *sna*-rg R2P2, dirige la expresión de eGFP en el mismo patrón que el fragmento original *sna*-rg expresa mCherry. (B-B'') comparación del patrón de expresión del enhancer mutado, *sna*-R2P2 Hox1&2mut, con el enhancer *sna*-rg que dirige la expresión de mCherry muestra la pérdida de expresión en algunas células tanto del primordio del CA como de la GP.

A continuación, se procedió a testar *in vitro*, la unión de Dfd con el sitio Hox3/Exd ya que, a pesar de no conocer su relevancia *in vivo*, las predicciones *in silico* sugieren que este sitio interaccionaría preferentemente con Dfd y Scr. Comprobamos que Dfd se une al sitio Hox3 como heterodímero y como monómero (Figura 17). La mutación del sitio Hox3 reduce significativamente la unión de Dfd a la sonda como heterodímero y como monómero. La misma mutación será analizada *in vivo* para comprobar cómo afecta a la activación del enhancer, individualmente y en combinación con el sitio Hox1.

Respecto a la interacción *in vitro* de Dfd con el sitio Hox1, observamos que la unión como monómero es preferente respecto a la unión heterodimérica Dfd/Exd (Figura 18).

Cabe destacar que, si bien el enhancer es activado genéticamente únicamente por Dfd y Scr, no podemos descartar que las proteínas Hox troncales, como Ubx, interaccionen directamente *in vivo* con el enhancer, funcionando a modo de represores. La posible función represora de los Hox troncales se estudiará genéticamente, por ejemplo, expresando a lo largo del tronco Dfd en un mutante Hox múltiple *Antp*, *Ubx*, *abd-A*, *Abd-B*, para comprobar si ahora los niveles de activación del enhancer *sna*-rg R2P2 en segmentos troncales y abdominales son mayores que en embriones en los que no existe falta de función de genes Hox troncales.

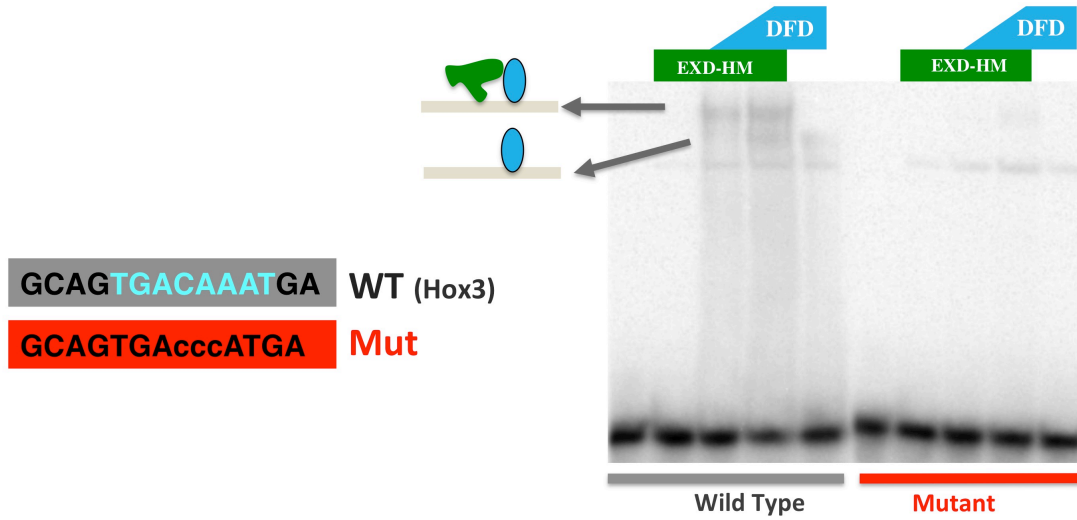


Figura 17. Interacción *in vitro* entre Dfd y el sitio Hox3/Exd de *sna-rg* R2P2. Dfd se une débilmente al sitio Hox3 tanto en complejo con Exd como en monómero. Ambas interacciones desaparecen en la versión mutante.

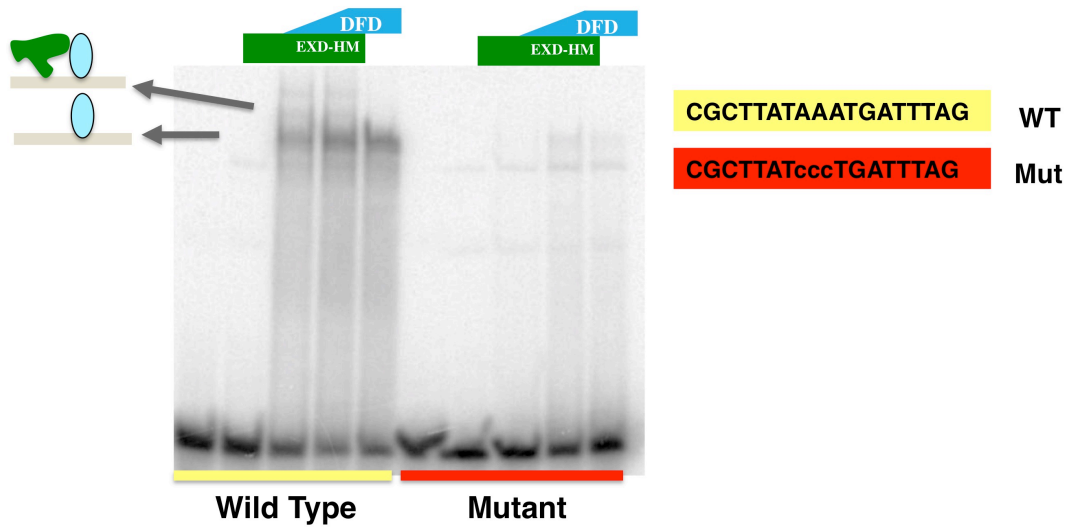


Figura 18. Interacción *in vitro* entre Dfd y el sitio de unión Hox1/Exd de *sna-rg* R2P2. Se comprobó la unión de Dfd al sitio Hox1 del *enhancer sna-rg* R2P2, en complejo con Exd y como monómero. La interacción de Dfd como monómero es preferente respecto a la unión heterodimérica. Existe una banda por encima del complejo Exd/Dfd en la sonda silvestre que podría corresponder al trimero Dfd-Dfd-Exd. La sonda mutante no muestra ninguna unión con Dfd/Exd, mientras que la unión monomérica se reduce fuertemente.

3. Identificación de nuevos reguladores genéticos del *enhancer snail-rg*

A pesar de que los genes *Dfd* y *Scr* se expresan en todo en el segmento labial y maxilar, *sna-rg* se activa sólo en la zona lateral indicando que los genes *Hox* deben interactuar con otros factores de transcripción o rutas de señalización para la activación localizada del *enhancer*. En este apartado, se presentan un conjunto de resultados orientados a la búsqueda de genes que con *Dfd* y *Scr*, contribuyan a la especificación del primordio de las glándulas endocrinas ectodérmicas.

Como ya vimos, *snail* se activa en el segmento maxilar en las células *vv1+2* mas ventrales que constituirán el primordio del *corpora allata*, mientras que en el labio, se activa en las células *vv1+2* más dorsales que formarán el primordio de la glándula protorácica (figura 1C y figura 19). El requerimiento de *vv1* en la activación de *snail-rg* fue testado previamente (sección publicaciones, artículo 1) comprobándose que no es necesario para activar *snail*.

3.1 Spalt

Hemos confirmado (sección publicaciones, artículo 1) que en mutantes *sal*, *Ubx* se expresa ectópicamente en T1 y en la región cefálica (Casanova, 1989). *Ubx* se observa a elevados niveles en el primer segmento torácico, a niveles más bajos en el segmento labial, siendo el segmento maxilar donde *Ubx* se expresa a menor nivel. *Ubx* activa el gen inductor de tráquea, *trachealess*, a elevados niveles en T1 y en los primordios de la glándula anular, especialmente en el segmento labial donde se puede observar la activación del marcador traqueal Tango, el desarrollo de una pequeña tráquea así como una fuerte disminución de la activación de *snail*, tanto a nivel de ARNm como del *enhancer snail-rg* (Figura 19). Esta disminución en la activación de *snail* en los precursores endocrinos podría deberse a represión por *Ubx* o *Trh*, o por un requerimiento de *sal*.

Para testar una posible función activadora de *sna-rg* por *spalt*, combinamos la deficiencia que elimina los genes *salm salr*, con un mutante *trachealess*. De esta manera podemos analizar cómo afecta la falta de función de *spalt* a la especificación o el comportamiento celular de los precursores endocrinos si se suprime la activación ectópica de la red genética traqueal en la región cefálica.

Sorprendentemente, comprobamos que el *enhancer sna-rg*, es activado en el segmento maxilar pero no en el segmento labial, desapareciendo el primordio de la glándula protorácica (Figura 20). Debido a que en el anterior contexto genético, a pesar de la falta de activación de *trh*, *Ubx* continúa expresándose ectópicamente, combinamos la deficiencia *salm salr* con la deficiencia para los genes *Hox* troncales, *Ubx abd-A Abd-B* (UAB), para descartar la represión de *snail-rg* en el segmento labial por *Hox* troncales. En este contexto genético, seguimos observando una fuerte reducción de los niveles de *snail-rg* en el segmento labial así como una ausencia del primordio de la GP (Figura 21).

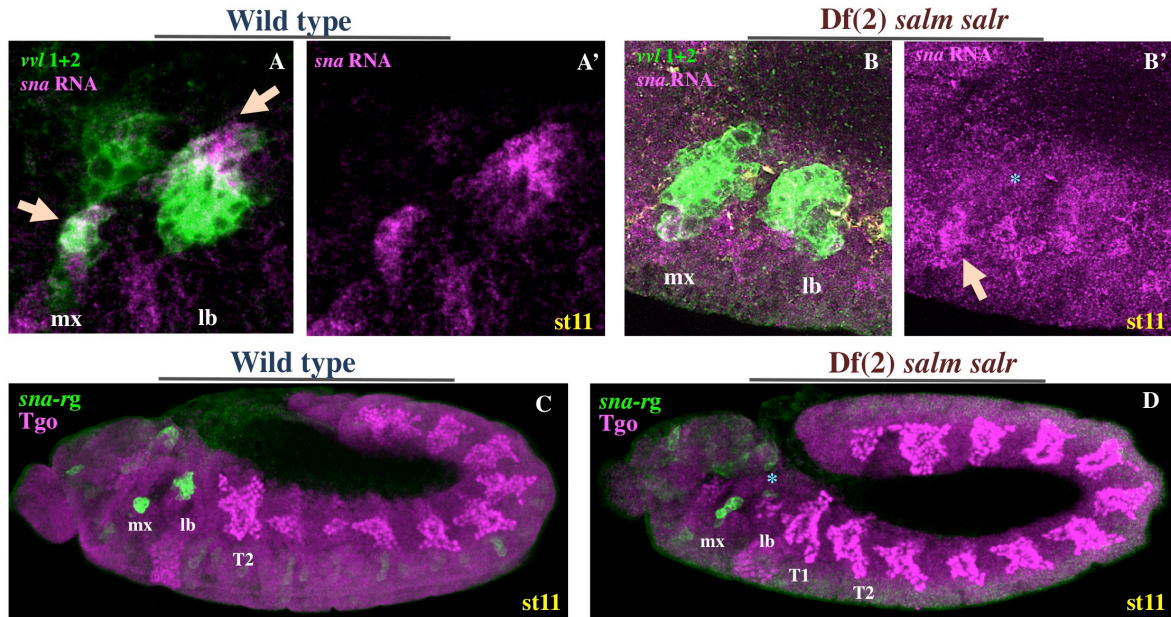


Figura 19. Expresión de *snail* en los precursores endocrinos de mutantes *spalt*. (A-A') Embrión silvestre, mostrando la expresión *in situ* del ARN de *snail* y de la proteína GFP dirigida por *vvl1+2*. Se observa la expresión de *snail* en las células *vvl1+2* ventrales del segmento maxilar y en células *vvl1+2* dorsales del segmento labial. (B-B') Mutante *spalt* donde se observa la expresión de *snail* únicamente en el segmento maxilar (flecha), desapareciendo del primordio de la glándula protorácica en el segmento labial (*). (C) Embrión silvestre, donde se muestra la activación de *snail-rg* en la maxila y el labio, así como la localización nuclear de Tango en los primordios traqueales, siendo la tráquea de T2, la más próxima a los precursores endocrinos. (D) Embrión mutante *spalt*, donde se observa activación de *snail-rg* en el segmento maxilar, y reducidos niveles en el segmento labial (asterisco) donde el precursor ectodérmico expresa el marcador de tráquea Tgo. También se observa la tráquea ectópica del primer segmento torácico.

El *corpora allata* conserva su capacidad de migración normal, si bien observamos defectos en la migración dorsal en una proporción de embriones debido muy probablemente a la ausencia de la glándula protorácica y la tráquea (sección publicaciones., artículo 2). Conjuntamente, estos datos abren la posibilidad de que *spalt* constituya un co-activador directo o indirecto de *snail* en el segmento labial o, impida la actividad de un elemento represor.

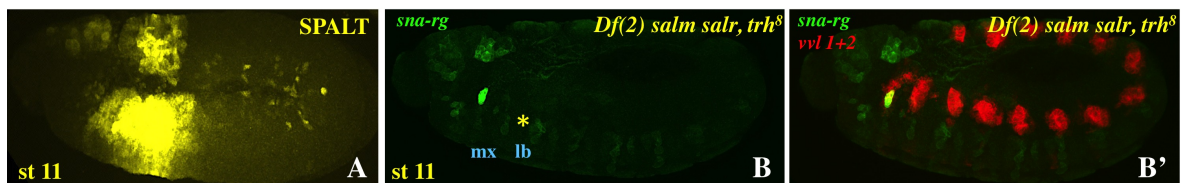


Figura 20. Requerimiento de *spalt* para la activación de *snail-rg* en ausencia de *trachealess*. (A) Embrión donde se muestra mediante *sal-Gal4* > *UAS-LacZ* el patrón de expresión de *spalt* en la región cefálica y en el noveno segmento abdominal durante la determinación de las glándulas. (B-B') Doble mutante *spalt, trachealess*, donde se muestra la activación de *snail-rg* únicamente en el segmento maxilar, desapareciendo el primordio de la glándula protorácica en el segmento labial (asterisco).

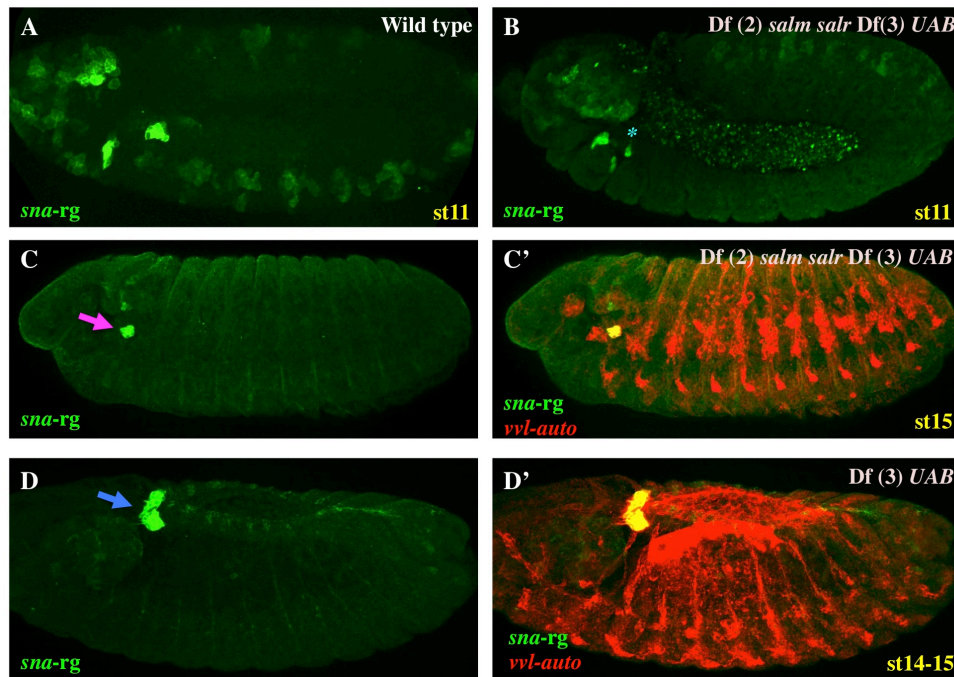


Figura 21. Requerimiento de *spalt* para la activación de *snail-rs* en ausencia de Hox troncales posteriores. (A) Embrión donde se muestra la activación de *snail-rs* en los primordios endocrinos en maxila y labio. (B) Embrión mutante para *spalt*, *Ubx*, *abd-A* y *Abd-B*, donde se muestra la activación de *snail-rs* únicamente en el segmento maxilar, observándose reducidos niveles de *snail-rs* en el segmento labial (*). (C-C') Mutante con falta de función para *spalt*, *Ubx*, *abd-A* y *Abd-B*, donde se muestra un caso donde el primordio del CA (flecha magenta) que no ha migrado dorsalmente debido a la ausencia de glándula protorácica. El marcaje de las tráqueas con el *enhancer vvl-auto*, permite observar la falta de formación del tronco traqueal dorsal (Lewis, 1978). (D-D'). Embrión únicamente mutante *Ubx*, *abd-A*, *Abd-B*, que no interfiere con la formación de la glándula anular (flecha azul).

3.2 Wingless y Hedgehog

Estudiamos la posible contribución de la vías de señalización de *hedgehog* y *wingless*, en la activación de *snail-rs*. La expresión de Wingless y Hedgehog durante los estadios de desarrollo 9-10 definen el borde de parasegmento. Más específicamente, *wingless* se expresa en las células posteriores de cada parasegmento y *hedgehog* en las anteriores (Lessing and Nusse, 1998; Mohler and Vani, 1992).

En mutantes *wingless* (figura 22), a pesar de la morfología aberrante, se aprecia un mayor número de células *snail-rs* en el primordio de la glándula protorácica, mientras que en el segmento maxilar, no existe aparentemente ninguna modificación en el número de células *snail-rs*. Para confirmar una actividad represora de *wingless* sobre la activación de *snail-rs*, lo sobreexpresamos en los segmentos maxilar y labial, comprobando la ausencia de células *snail-rs* en el embrión (fig 22D).

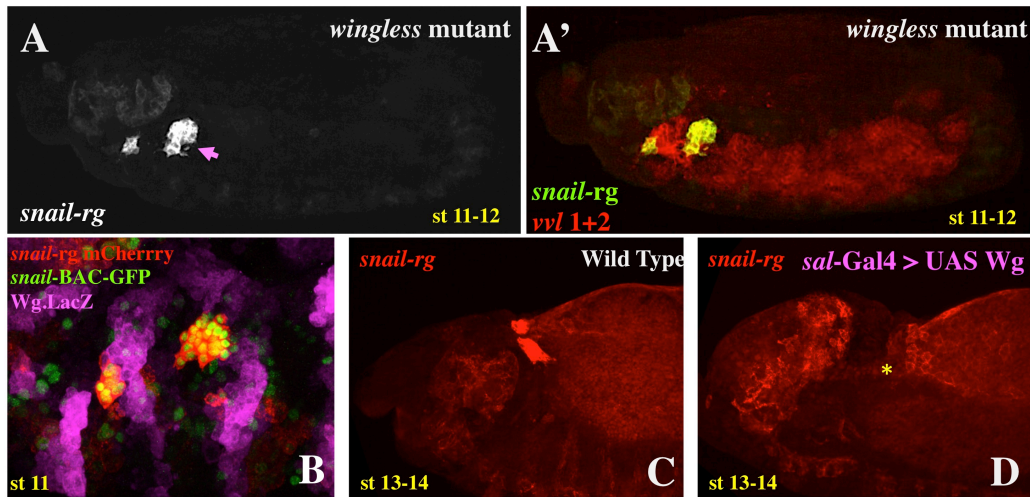


Figura 22. Requerimiento de *wingless* para la activación de *snail*. (A-A') Embrión mutante *wingless*, en el que se aprecia (flecha magenta) el incremento en el número de células *snail-rg* en el segmento labial, particularmente a nivel ventral. Los mutantes *wingless* también exhiben una expansión de la expresión de *ventral veinless* a lo largo del tronco. (B) Expresión de *wg-LacZ* con respecto a las células *snail-rg* en un estadio 11. (C-D) Vista de un embrión control (C) y un embrión *sal-Gal4* sobreexpresando *wingless* en la cabeza donde no se observan células *snail-rg* (D).

Por otro lado, testamos el requerimiento de la vía de señalización de *hedgehog* (*hh*) en la activación de *sna-rg*. Para estudiar si la ruta se activa en los primordios glandulares estudiamos la expresión de *sna-rg* respecto a *hh-lacZ* y *patched-GFP*. Patched es el receptor de *hh* y está sujeto a control por *feed-back* positivo de la ruta de señalización, por lo que sirve como marcador de actividad (Ingham et al., 2011). Doble marcaje *ptc-GFP* y *sna-rg-mCherry* indica que la ruta se activa en las células del CA y la GP (Figura 23B). En mutantes *hh*, observamos que la expresión de *sna-rg* desaparece completamente en los segmentos maxilar y labial (Fig. 23D).

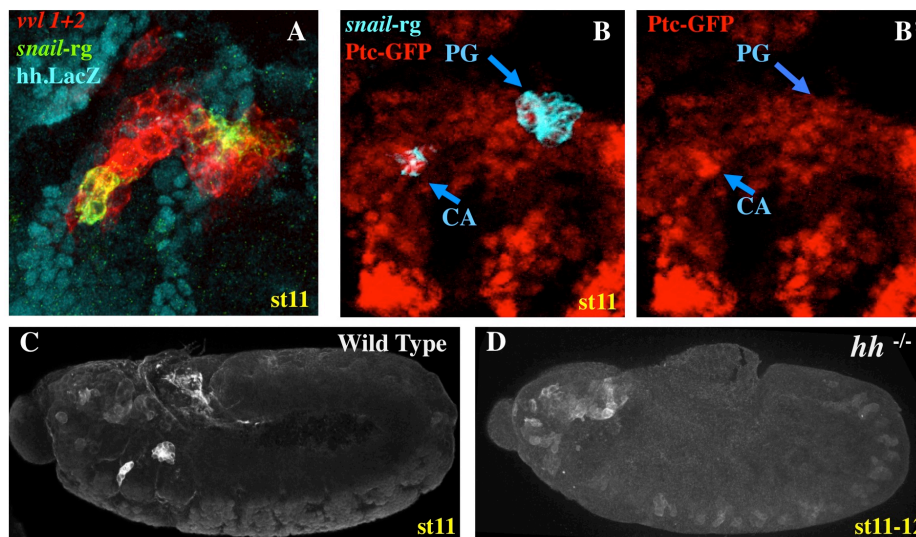


Figura 23. Requerimiento de la vía de señalización de *hedgehog* para la activación de *snail-rg*. (A) Expresión de *hedgehog* (*hh.LacZ*, azul), *vvl1+2* (rojo) y *snail-rg* (verde). (B-B') Patrón de expresión de *patched*, visualizado mediante una línea *enhancer-trap*. Aunque los niveles de expresión son más bajos en el primordio de la glándula protorácica, la vía de señalización es requerida para activar *snail-rg* en ambos primordios ya que la activación de *snail-rg* desaparece en un mutante *hedgehog* en comparación con un embrión silvestre (C-D).

Aunque en base a resultados muy preliminares, parece que tanto la señalización de *hedgehog* como la de *wingless*, en cooperación con los genes homeóticos *Dfd* y *Scr*, podría contribuir mediante co-activación y represión al establecimiento del patrón de expresión de *snail*-rg.

La represión por *wingless* afectaría principalmente a la activación de *sna*-rg en el segmento labial, ya que, un mutante *wingless*, aparentemente no incrementa ni disminuye el número de células *snail*-rg en el segmento maxilar, si bien, su sobreexpresión en la cabeza puede reprimir al *enhancer sna*-rg en ambos segmentos.

En el caso de *hedgehog*, la disminución de la activación del *enhancer sna*-rg en ambos segmentos, demuestra la implicación de esta vía de señalización en la activación de *snail*, ya sea como co-activador directo o indirecto.

4. Supresión de la función de *snail* en los primordios del *corpora allata* y la glándula protorácica mediante el sistema CRISPR/Cas9

4.1 Uso del sistema CRISPR/Cas9 para deleccionar *snail*-rg

Uno de los objetivos de esta tesis doctoral ha sido el estudio de la función del regulador de EMT *snail* en los precursores endocrinos de *Drosophila melanogaster*. Inicialmente conseguimos eliminar la función de *sna* de los primordios glandulares sin afectar la expresión de *sna* en otros tejidos, utilizando una compleja combinación genética en la que la función de un mutante *sna* nulo se rescata de todos los tejidos excepto de las glándulas (sección publicaciones, artículo 1). Esto fue posible debido a que localizamos la región genómica donde se encuentra *sna*-rg y a que existía un Cromosoma Bacteriano Artificial (BAC) que expresa *sna*-GFP bajo el control de toda la región cis-reguladora *upstream* de *sna* a excepción del elemento *sna*-rg (Dunipace et al., 2011). Este elemento BAC nos permitió generar moscas mutantes *snail*, donde rescatamos la función de Sna en todos los tejidos excepto de los primordios del *corpora allata* y la glándula protorácica. Sin embargo, debido a la complejidad genética de este sistema decidimos generar mediante el sistema CRISPR/Cas9 una delección del *enhancer sna*-rg R2 (figura 13) en el locus de *snail*.

El establecimiento del sistema CRISPR/Cas9 como una nueva tecnología genética, permite la edición de cualquier secuencia genómica de una manera rápida y con bajo coste (Ran et al., 2013). El sistema CRISPR/Cas9, es una aplicación (figura 24) derivada del mecanismo defensivo de bacterias y arqueobacterias contra plásmidos o virus (Barrangou et al., 2007).

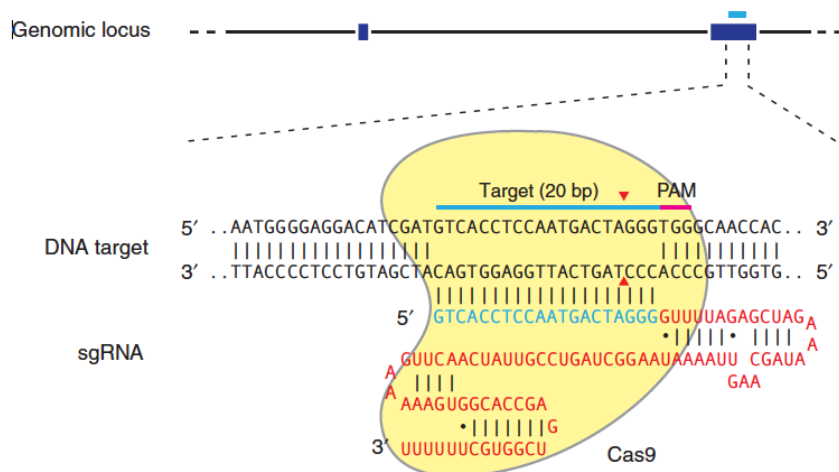


Figura 24. Mecanismo de escisión del ADN mediante el sistema CRISPR/Cas9. El esquema representa a la endonucleasa Cas9 (figura amarilla), dirigida a una secuencia diana específica, por un gRNA (ARN guía). El gRNA es una molécula quimérica resultado de la fusión entre la secuencia diana de interés (*target site*) que proporciona la especificidad del sitio de corte, y la secuencia invariable tracrRNA (*trans-activating CRISPR RNA*), que actúa como soporte estructural con la endonucleasa Cas9. El gRNA hibrida con la secuencia diana, siendo indispensable la existencia en el genoma de una secuencia PAM (*protospacer adjacent motif*), nGG, 5' respecto a la secuencia diana, para que la proteína Cas9 realice el corte de doble cadena. El corte de la doble cadena, será reparado mediante un mecanismo de unión de extremos no homólogos (cuya siglas en inglés es NHEJ) que frecuentemente introduce mutaciones en forma de pequeñas inserciones o deleciones (*indels*). **Figura adaptada de (Ran et al., 2013).**

Recientemente, el sistema CRISPR/Cas9 (figura 24), se ha adaptado para su utilización en *Drosophila melanogaster* (Bassett et al., 2013; Port et al., 2014), habiéndose generado un conjunto de herramientas que facilitan la manipulación genética. Entre otras se han generado vectores para clonar el gRNA de interés y expresarlo ubicuamente en moscas transgénicas, así como transgénicos para la expresión dirigida de la endonucleasa Cas9. Por otro lado, existen aplicaciones bioinformáticas para la búsqueda de secuencias diana para la edición con el sistema CRISPR/Cas9 en el genoma de *Drosophila melanogaster*.

Seleccionamos dos gRNAs que hibridarían en zonas flanqueantes del *enhancer sna-rg R2* (1.2 kb) permitiendo su deleción. Para comprobar la eficiencia del sistema de deleción realizamos un diseño experimental que permite observar la generación de deleciones en la construcción *sna-rg-GFP*. Para ello obtuvimos moscas que contienen el *enhancer sna-rg-GFP* y simultáneamente expresan ubicuamente Cas9 y los gRNA flanqueantes del *enhancer* (figura 25; material y métodos suplementarios).

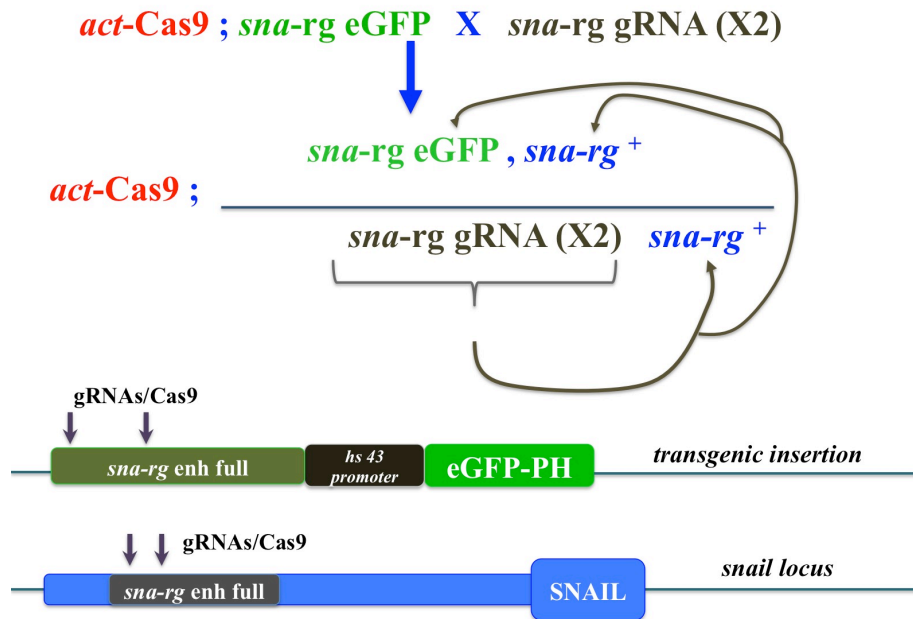


Figura 25. Diseño experimental para deletar el enhancer *sna-rg* R2. Para comprobar la eficiencia de los gRNAs que dirigirían la delección del enhancer *sna-rg* R2, generamos moscas transgénicas *sna-rg gRNA (X2)* que expresan los dos gRNAs simultánea y ubicuamente (véase mat&met suplementarios), y lo combinamos con el transgénico que expresa la endonucleasa Cas9 bajo el control del promotor de la actina5C, y con el transgénico *sna-rg-eGFP*. Asumiendo una eficiencia elevada del sistema, esperaríamos la generación de células con delecciones tanto para el enhancer del locus endógeno o con delecciones para el enhancer del transgénico que dirige la expresión de eGFP y por tanto, eliminaría la expresión de eGFP.

Comprobamos que la coexpresión de ambos gRNAs y la endonucleasa Cas9 eliminó la mayor parte de la expresión de eGFP dirigida por el *reporter sna-rg-eGFP* (figura 26). En este experimento, esto puede ocurrir por la delección de la zona reguladora del marcador *sna-rg-eGFP* (en cuyo caso el desarrollo de las células de la glándula no estaría afectado) o por la delección del enhancer endógeno de *sna* que resultaría en la apoptosis de la glándula como hemos mostrado anteriormente (sección publicaciones, artículo 1). Estas dos alternativas se pueden reconocer si usamos marcadores independientes que marquen las glándulas (como las proteínas Sal y Svp) que permite reconocer si lo que desaparece es tan solo la expresión del marcador GFP o la glándula. La tinción contra la proteína Spalt, mostró que la mayor parte de las células de la glándula protorácica desaparecían, y que aquellas que no mueren pierden frecuentemente el marcador GFP.

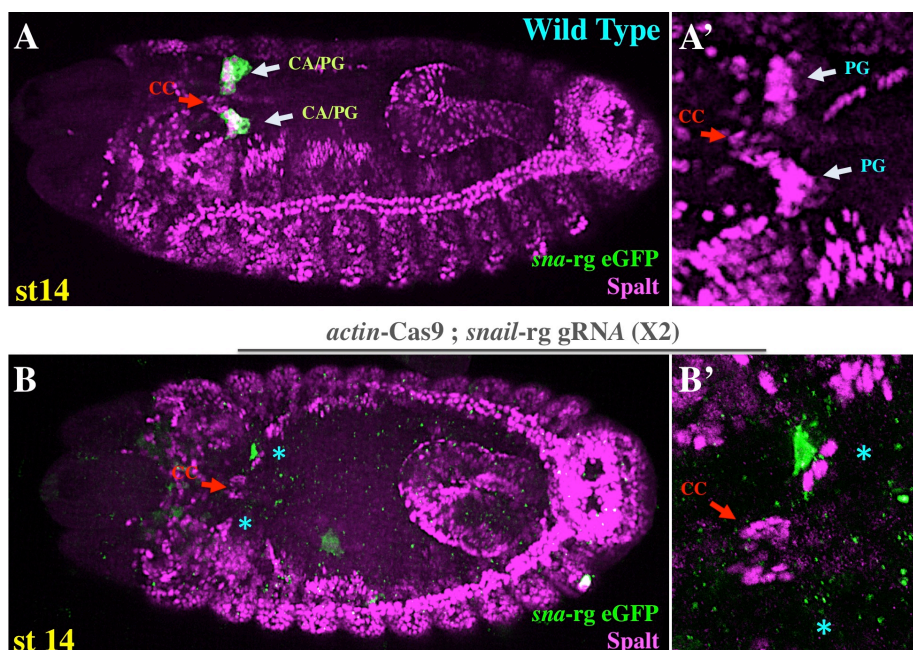


Figura 26. Generación de deletiones del *enhancer* *snail-rs*. (A) Embrión silvestre donde el primordio del CA/PG se encuentra marcado por el *reporter* *sna-rs-eGFP* y las células de la glándula protorácica están también marcadas con anti-Spalt. En la ampliación de la derecha se muestra solo Sal y se observa que también las células del *corpora cardiaca* (CC) expresan *spalt*. (B) Vista dorsal de un embrión donde la combinación de la línea *sna-rs* gRNA(X2), junto con la línea *actin5C-Cas9*, genera deletiones que conducen a la falta de activación de *snail* en la mayor parte de las células que darán lugar al primordio del CA y la PG. En uno de los primordios contralaterales (asterisco inferior) las células morirían por apoptosis, no observándose ninguna célula de la glándula protorácica. En el otro primordio (asterisco superior) se observan tres células sobrevivientes de la glándula protorácica, que habrían perdido la actividad *reporter* del constructo *sna-rs-eGFP*, así como, una célula del *corpora allata* que expresa *sna-rs-eGFP* pero no expresa Spalt.

Por tanto, el fenotipo observado correspondería a dos tipos de deletiones simultáneas (figura 26): (1) células que han perdido las dos copias del *enhancer* del locus de *sna* endógeno, y que por falta de Sna han muerto por apoptosis impidiendo la visualización del *enhancer* *sna-rs-eGFP* y, (2) células que conservan el *enhancer* del locus de *sna* endógeno pero han perdido el *enhancer* marcador que dirige la expresión de eGFP. Estas células pueden ser reconocidas en la glándula protorácica por la tinción con anti-Spalt (Figura 26).

Vista la alta eficiencia en la generación de deletiones procedimos a generar deletiones del *enhancer* *sna-rs* endógeno en la línea germinal utilizando la línea *nos-Cas9* (material&métodos suplementarios) con el objetivo de conseguir un alelo de *sna* con una deletión del *enhancer* *sna-rs* R2 (material&métodos suplementarios). Los posibles mutantes heterocigóticos descendientes se cruzaron individualmente por hembras mutantes *sna*¹/CyO nulos. En la F2 se seleccionaron las moscas heterocigóticas cuyos hermanos eran letales sobre *sna*¹. Se aislaron varios alelos letales independientes en los cuales confirmamos la existencia de la deletión mediante PCR y secuenciación (mat&met suplementarios).

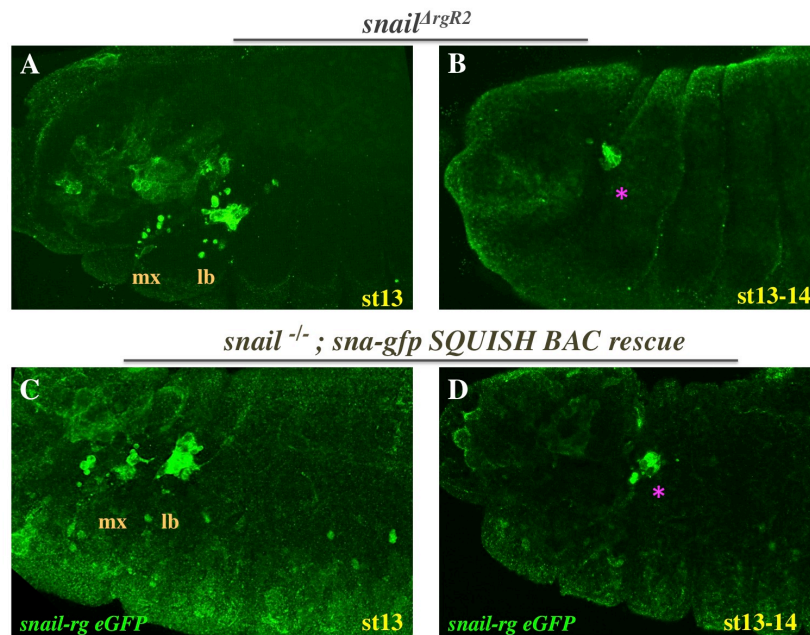


Figura 27. Fenotipo del alelo $snail^{\Delta rgR2}$. (A-B) La delección de la region genómica que abarca el *enhancer sna-rg* R2, causa apoptosis en la mayoría de las células de los primordios del *corpora allata* y la glándula protorácica en st13, fenotipo similar al observado en los mutantes *snail* rescatados con el SQUISH BAC de *snail* (C-D). El asterisco magenta (B y D), muestra las células endocrinas remanentes integradas en el ectodermo embrionario.

Comprobamos que en embriones homocigóticos para la delección generada mediante CRISPR, $snail^{\Delta rgR2}$, se produce apoptosis en los primordios endocrinos al igual que ocurre cuando la falta de función de *snail* es generada por el método de rescate con el BAC *squish* incompleto (Figura 27; sección publicaciones, artículo 1).

Finalmente, para comprobar que el fenotipo observado en los primordios endocrinos resulta de la falta de función de *snail* y no es consecuencia de una o más mutaciones inespecíficas generadas con el sistema CRISPR/Cas9 en otra región del genoma, rescatamos $snail^{\Delta rgR2}$ con el BAC *snail*-GFP (Sección publicaciones, artículo 1; Dunipace et al., 2011), que contiene toda la región *cis*-reguladora *upstream* de la secuencia codificadora de *snail*. El resultado fue un rescate de la viabilidad de los precursores endocrinos, los cuales completan su morfogénesis dando lugar a la glándula en anillo (Figura 28).

Estos experimentos demuestran que el *enhancer sna-rg* es el único *enhancer* que activa la expresión temprana de *snail* en el primordio del *corpora allata* y la glándula protorácica, indicando que no existen otros *shadow enhancers* redundantes (Perry et al., 2010) que pudieran activar la expresión de *snail* en la glándula. En definitiva, el alelo $snail^{\Delta rgR2}$ permitirá abordar la función de *snail* en la glándula anular de una manera genéticamente más sencilla.

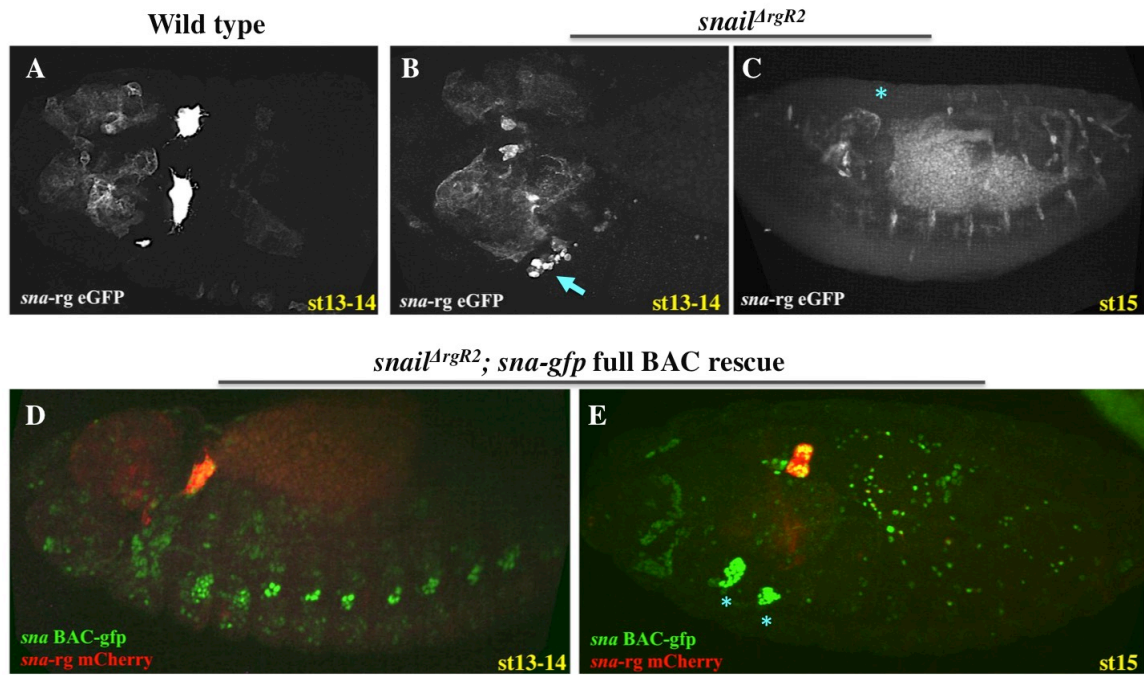


Figura 28. Rescate del alelo *sna*^{ArgR2} con el BAC *sna-gfp*. (A) Migración dorsal del primordio del CA/PG en un embrión silvestre. (B-C) Embriones *sna*^{ArgR2} homocigóticos, donde los primordios del *corpora allata* y la glándula protorácica degeneran por apoptosis (flecha azul y asterisco). (D-E) Mutantes *sna*^{ArgR2} rescatados con el BAC *sna-gfp*, cuya región *cis*-reguladora abarca al *enhancer* *sna*-rg, demostrando que el fenotipo en los precursores endocrinos se debe a la falta de función de *snail*. Los asteriscos en (E) señalan los primordios de ala y halterio.

Por otro lado la eficiente generación de deleciones somáticas en el embrión inducidos por el sistema CRISPR/Cas9, nos ha permitido diseñar nuevas herramientas genéticas que nos permitirán profundizar en el conocimiento de la biología celular del CA y la GP, como presentamos a continuación.

4.2. Análisis del comportamiento de grupos celulares aislados del CA/GP mediante la inducción de letalidad con CRISPR

Los primordios del CA y la GP están constituidos, respectivamente, por 6-7 y 17-20 células, que se fusionan dando lugar a un primordio de células de 24-27 células (a cada lado del embrión) que migran colectivamente y de forma cohesiva hasta posiciones dorsales (sección publicaciones, artículo 2).

Tras observar que el primordio de CA puede migrar en ausencia del primordio de GP y viceversa, nos propusimos descubrir si todas las células tienen capacidad migradora independiente o si existen células especializadas que guían el primordio y otras que serían arrastradas pasivamente.

Debido a que el marcador *snail*-rg se expresa en todas las células del primordio, en los experimentos descritos hasta ahora, no ha sido posible analizar el comportamiento de células únicas (video suplementario 1).

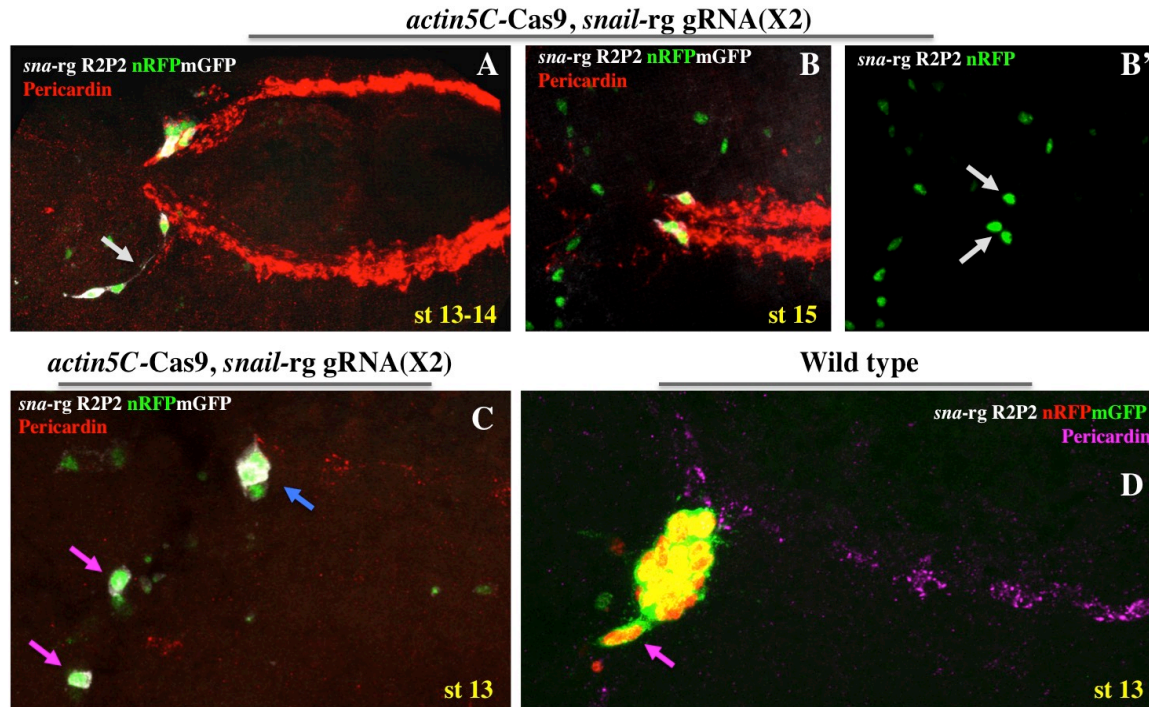


Figura 29. Generación de células glandulares aisladas y análisis de su comportamiento migratorio. (A-D) Migración hacia el primordio de la aorta (marcado con anti-Pericardina) de células de la glándula marcadas con *snail-rg R2P2-nRFPmGFP*. (A-C) Migración de células endocrinas supervivientes tras la generación de deleciones del *enhancer endógeno snail-rg R2* mediante CRISPR. (A) Se observan dos células, una dorsal en contacto con la aorta y otra, localizada ventralmente, en contacto a través de una extensión de membrana (flecha blanca). Este embrión puede corresponder a la situación que ejemplifica el **video suplementario 2**, donde células en posiciones más dorsales mantienen el contacto con células en posiciones ventrales a través de largas extensiones de membrana. (B-B') Vista dorsal de un embrión donde se observa una única célula endocrina que ha completado la migración dorsal en un lado, así como dos células endocrinas contralaterales. Este embrión puede corresponder a la situación que ejemplifica el **video suplementario 4**, donde únicamente tres células endocrinas supervivientes alcanzan posiciones dorsales en contacto con la aorta. (C) Se observan tres células (flecha azul) que han contactado con la aorta, mientras que dos células supervivientes (flechas magenta) probablemente no alcanzarán posiciones dorsales ya que ni han contactado con la aorta ni con las células endocrinas más dorsales. (D) Primordio CA/GP silvestre (27 células aproximadamente) contactando con la aorta. La flecha magenta señala a las dos células más ventrales del primordio (probablemente del CA) que aún no contactando con la aorta, la afinidad o adhesividad hacia el resto de células endocrinas probablemente les permitirá quedar integradas en el primordio y alcanzar posiciones dorsales.

Con el objetivo de estudiar si células únicas del primordio pueden migrar por si solas, marcamos todas las células de los primordios de las glándulas, a la vez que indujimos muerte celular en el primordio generando deleciones somáticas aleatorias del *enhancer endógeno snail-rg R2* con el sistema CRISPR/Cas9. Para hacer este experimento, generamos un nuevo marcador en el que el *enhancer snail-rg R2P2* (figura 13) dirige la expresión simultánea de mCherry nuclear y eGFP de membrana (módulo nRFPmGFP; sección publicaciones, artículo 2). Este marcador nos permite observar la generación de proyecciones de membrana, a la vez que podemos saber el número de células marcadas contando los núcleos asociados.

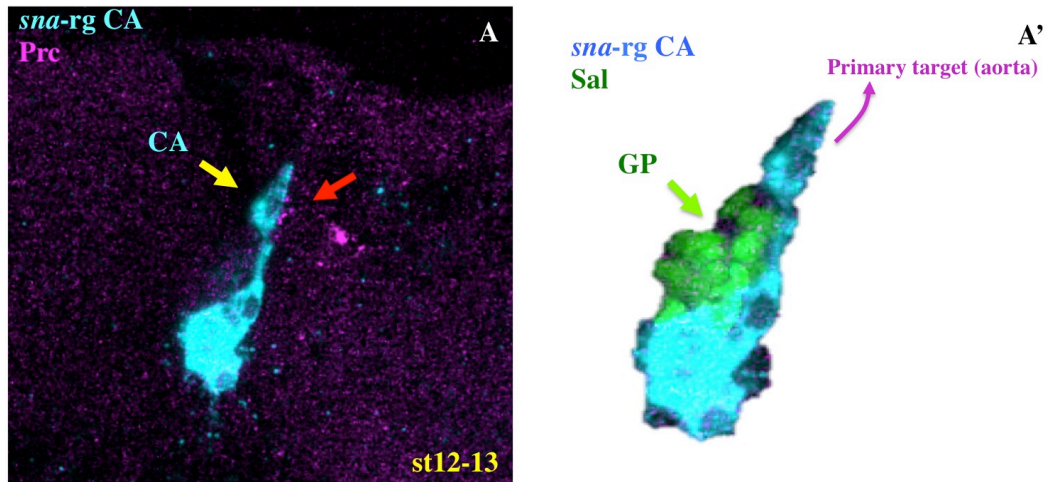


Figura 30. Comportamiento de las células del primordio del corpora allata tras la coalescencia con la glándula protorácica. (A-A') Embrión donde el *corpora allata* se visualiza con el marcador *sna-rg CA*. La glándula protorácica está teñida con anti-Sal (flecha verde), y la aorta con anti-Pericardina. Se puede observar que la mayor parte de las células del primordio del CA se localizan ventralmente respecto a la GP, sin embargo una o dos células del CA (flecha amarilla) rodean la glándula protorácica utilizándola como sustrato, para situarse dorsalmente e interactuar con la aorta (flecha roja). Véase también, [video suplementario 5](#).

La elección del *enhancer snail-rg* R2P2 para dirigir la expresión, se debe a que no contiene uno de los gRNAs utilizado para deleccionar el *enhancer sna-rg* R2 ya que es un fragmento más corto (Figura 13; [mat&met suplementarios](#)), lo cual nos permite usarlo como marcador estable a la vez que podemos deleccionar el *enhancer sna-rg* R2 endógeno. Por tanto, este sistema permite inducir la delección del *enhancer sna-rg* R2 endógeno y a la vez marcar las células que sobreviven para analizar el comportamiento migratorio de unas pocas células remanentes.

La combinación del marcador *snail-rg* R2P2 nRFPmGFP con nuestro sistema de generación de falta de función de *snail* nos permitió observar situaciones en las que una única célula endocrina superviviente es capaz de contactar con el primordio de la aorta y migrar dorsalmente (Figura 29; [video suplementario 4](#)).

Destacan especialmente, aquellos casos en los que una, o unas pocas células, supervivientes quedan inicialmente en posiciones ventrales, debido a que probablemente, la mayor parte de las células del primordio en las que estarían integradas murieron. Sin embargo, estas células aisladas son capaces de desplazarse dorsalmente al contactar a través de largas extensiones de membrana con una única célula o unas pocas células que sí han contactado con el primordio de la aorta, probablemente localizadas originalmente a una menor distancia de la aorta (Figura 29; [videos suplementarios 2 y 3](#)).

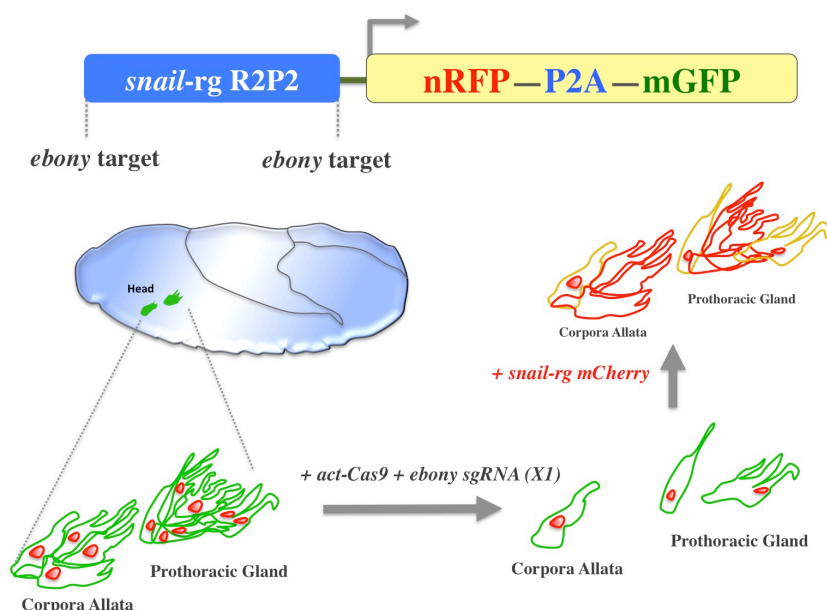


Figura 31. Uso del sistema CRISPR/Cas9 para el marcaje individual de células. El sistema consiste en introducir una secuencia diana para un gRNA flanqueando el enhancer del gen marcador. En este caso hemos introducido una secuencia del gen *ebony* (*e*) (Port et. al 2014) a ambos lados del *enhancer* *snail*-R2P2 que activa el marcador. Al combinar el marcador, e-*snail*-rg R2P2--e nRFP-mGFP que dirige la expresión de una proteína fluorescente en el primordio CA/GP, con constructos que expresan ubicuamente tanto la endonucleasa Cas9 como el gRNA específico de *ebony*, se generarán delecciones del *enhancer* marcador (también se podrían generar mutaciones en el gen *ebony* endógeno pero estas no afectan el desarrollo) de tal manera que solo aquellas células que no hayan sufrido la delección expresarán los marcadores, pudiendo estudiar su comportamiento individualmente. Para conocer la extensión del primordio también se pueden introducir otros marcadores fluorescentes como el *enhancer* de *snail* (*sna*-rg mCherry en este caso) sin secuencias diana *ebony* para CRISPR.

Cabe destacar que, aunque la aleatoriedad del proceso de delección del *enhancer* *sna*-rg R2 resulta en un elevado número de situaciones distintas, el comportamiento celular observado en aquellos casos en los que el número de células endocrinas supervivientes es bajo (entre una y siete células), nos permite inferir que probablemente todas las células del primordio tienen capacidad migradora.

5. Análisis del comportamiento celular de los primordios del *corpora allata* y la glándula protorácica en embriones silvestres

Para confirmar que todas las células en el primordio silvestre tienen un comportamiento migratorio activo hemos realizado distintos experimentos. Primero utilizamos el nuevo marcador específico *sna*-rg CA (descrito en la sección 2.2.1), que permite distinguir las células del *corpora allata* respecto a las de la glándula protorácica. Esto nos permite observar cómo algunas células o incluso una sola célula del CA localizada inicialmente ventralmente y por detrás de la GP respecto al sentido de migración, es capaz de migrar dorsalmente rodeando a la GP y situarse por delante en interacción con la aorta, siempre manteniendo la cohesión con el primordio endocrino (Figura 30). Estos resultados demuestran que tras la coalescencia con la GP, las células del CA no pierden su capacidad migratoria (Figura 30 y video suplementario 5).

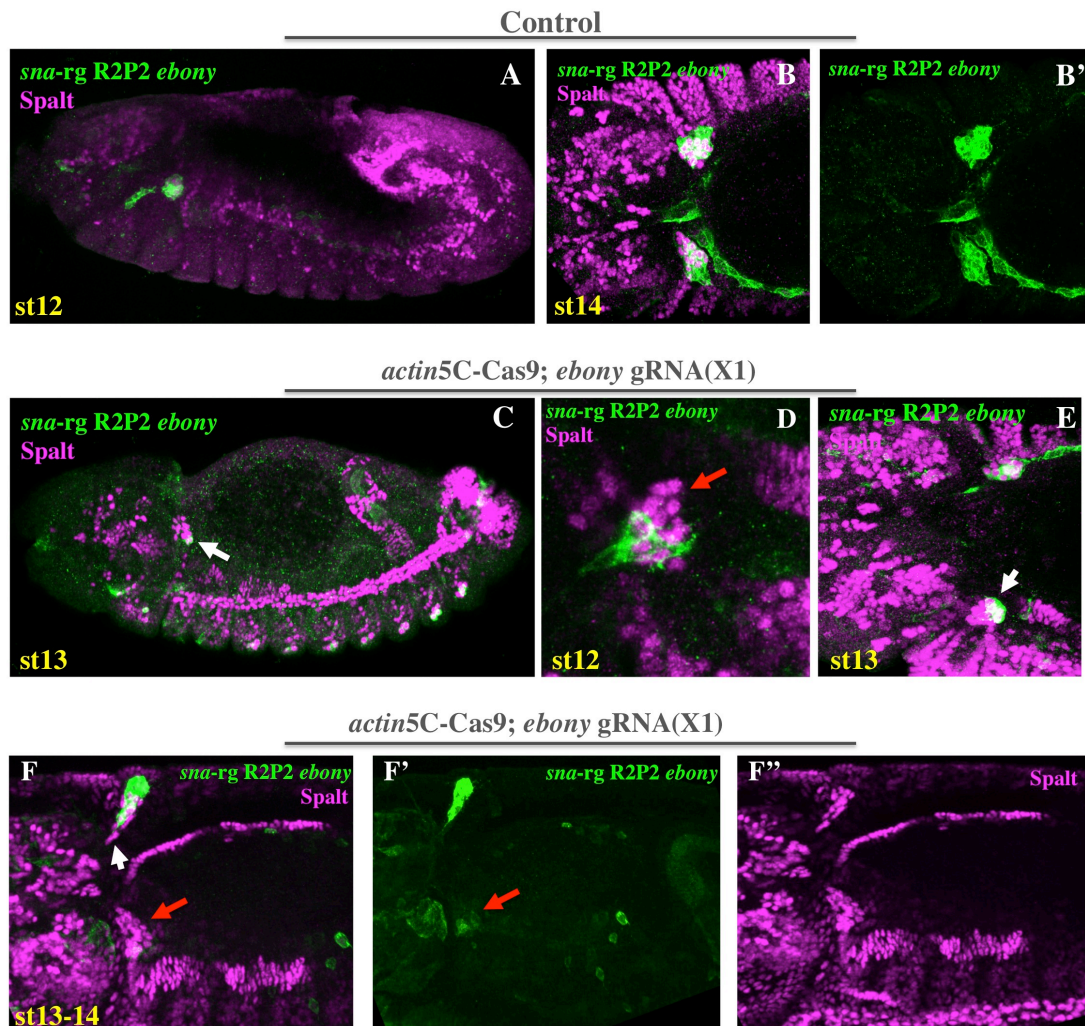


Figura 32. Uso del sistema CRISPR/Cas9 para la generación de clones fluorescentes (2). (A-B') Se muestran embriones silvestres expresando eGFP de membrana bajo el control del *enhancer snail-rg R2P2 ebony* teñidos con GFP y anti-Sal. La expresión es completamente normal observándose todas las células Spalt de la glándula protorácica expresan GFP. (C-F) El mismo *enhancer snail-rg R2P2 ebony* pero en embriones expresando *actin5C-Cas9* y *ebony* gRNA. La delección del *enhancer* permite distinguir grupos de células dentro del primordio. (C) Muestra un primordio del CA/PG en el que solo permanece marcada una célula de la glándula protorácica. No se observan células GFP del CA, las cuales no expresan Spalt. (D) Mosaico en el que se muestra que las células dorsales de la glándula protorácica (flecha roja) han perdido el marcador *snail-rg R2P2 eGFP ebony*. (E) La flecha blanca señala otro primordio CA/GP, donde solo un subgrupo de células de la GP mantienen el marcador GFP. (F-F'') Se muestra un primordio donde se ha perdido prácticamente toda la expresión de GFP (flecha roja). En el primordio contralateral solo un reducido número de células dorsales de la GP han perdido la expresión.

El *enhancer snail-rg R2P2 ebony* (figura 32), marca las células de primordio en condiciones normales, pero si lo combinamos con construcciones que expresen el gRNA de *ebony* y la proteína Cas9, la mayor parte de las células del primordio delecionan el *enhancer* y perderán la expresión permitiendo la observación de las pocas células que mantienen el *enhancer*. El uso de las secuencias *ebony* flanqueantes permite delecionar el *enhancer snail-rg R2P2* dirigiendo la expresión del marcador fluorescente, sin afectar al *enhancer snail-rg R2* endógeno. Las células que expresen el marcador, serán las que no hayan sufrido la delección del *enhancer*.

Hemos comprobado que el sistema es altamente eficiente, generando situaciones en las que marcamos desde una sola célula a un reducido grupo (figura 32). Esto nos permitirá analizar *in vivo*, el comportamiento de células individuales dentro del primordio y su interacción con otras células del propio primordio o de órganos diana como la aorta o la tráquea.

6. Identificación de los precursores endocrinos en embriones de otras especies de artrópodos

A pesar de que todos los artrópodos mudan la cutícula, en muchas especies aún no se ha identificado ni el origen embrionario de las glándulas endocrinas ni su localización al finalizar la embriogénesis. Nos planteamos la posibilidad de que algunos de los genes expresados en las glándulas de *Drosophila* se expresen en las glándulas endocrinas de otras especies y por tanto pudieran servir para identificarlas. En este último apartado se describen los experimentos realizados para tratar de identificar los primordios homólogos al *corpora allata* y a la glándula protorácica en araña y ciempiés. Para ello analizamos mediante hibridación de ARN *in situ* la expresión de genes homólogos a los que se expresan en glándulas de *Drosophila melanogaster*. Estos experimentos fueron realizados durante dos estancias breves llevadas a cabo durante la realización de esta tesis.

Se realizó una primera estancia de dos meses en el laboratorio del Dr. Alistair MacGregor (*Oxford Brooks University*, Reino Unido) para estudiar la araña *Parasteatoda tepidariorum*, seguida de una estancia de un mes en el laboratorio del Dr. Michael Akam (*University of Cambridge*, Reino Unido), con el objetivo de estudiar el centípedo, *Strigamia maritima*.

Uno de los principales objetivos de la identificación de los precursores endocrinos en otras especies de artrópodos actuales, sería reconstruir en base a los datos obtenidos en cada grupo (quelicerados, miriápodos, crustáceos e insectos; Figura 33), cómo evolucionaron del ancestro común el sistema endocrino y respiratorio de los artrópodos actuales.

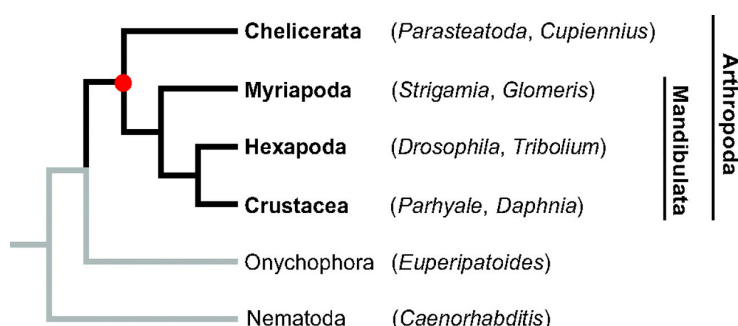


Figura 33. Relaciones filogenéticas entre distintos grupos de artrópodos. El círculo rojo enfatiza la ramificación entre artrópodos quelicerados y otros artrópodos. También se representan otros grupos de invertebrados externos. Adaptado de (Hilbrant et al., 2012).

6.1 Búsqueda de los precursores endocrinos en *Parasteatoda tepidariorum*

Dada su posición filogenética, *Parasteatoda tepidariorum*, comúnmente conocida como araña domestica (figura 33), constituye un interesante modelo para estudiar la evolución de los mecanismos de desarrollo en artrópodos (figura 35) contribuyendo a diferenciar qué aspectos de la biología del desarrollo pueden ser ancestrales, respecto a las novedades evolutivas de cada grupo.

Con el fin de identificar los primordios de los órganos endocrinos, se estudiaron los estadios del desarrollo 11-12, una vez iniciada la expresión de los genes Hox y por tanto de la organogénesis a lo largo del eje antero-posterior del embrión (Khadjeh et al., 2012). Para ello se realizaron *in situ* con sondas para genes los genes *Pt-vvl*, *Pt-trh* y *Pt-snail* (material&métodos suplementarios). No pudimos identificar un homólogo de *phantom*, enzima involucrada en el metabolismo de la ecdisona.

Las arañas poseen dos sistemas de respiración: un sistema traqueal y unos pulmones en libro (*bl*). Estos últimos son órganos respiratorios localizados en el opistosoma o región abdominal, formados por pliegues de tejido, que maximizan el intercambio gaseoso y que conectan con el exterior por una pequeña apertura.

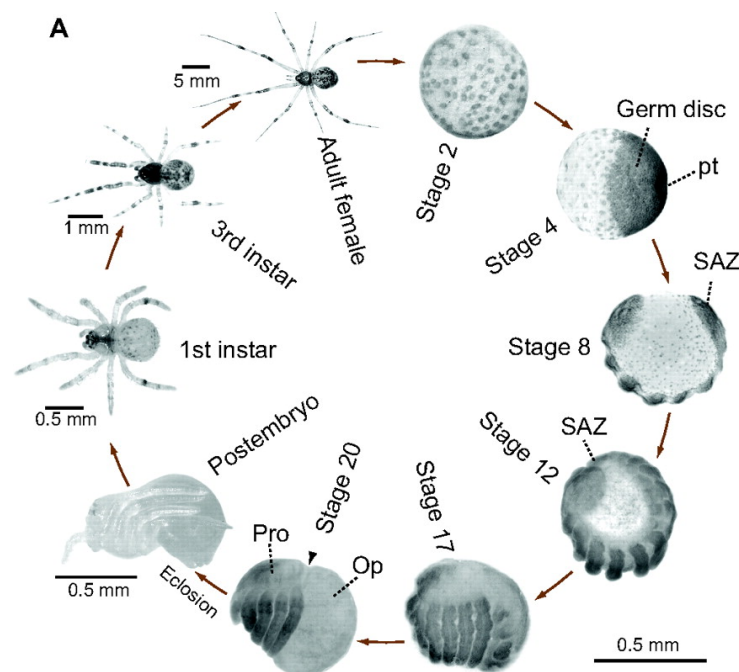


Figura 34. Ciclo de vida de *Parasteatoda tepidariorum*. La detección *in situ* de ARN se realizó en un estadio 11 y 12 tardío donde se aprecian las patas repliegadas y los dominios de expresión de los genes homeóticos están definidos (Khadjeh et.al; 2012). Anterior se sitúa a la izquierda en todos los estadios. Adaptado de (Hilbrant et al., 2012).

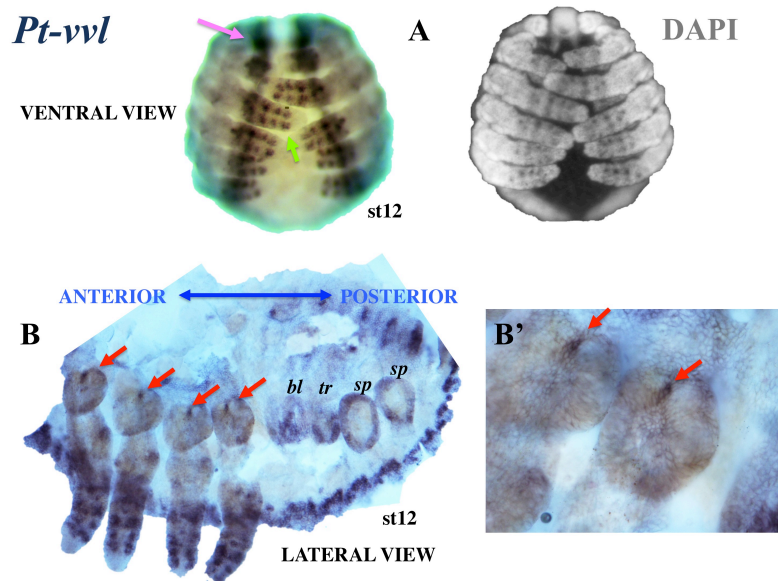


Figura 35. Expresión de *ventral veinless* en *Parasteatoda tepidariorum*. (A) Vista ventral de un embrión donde se aprecia la línea de expresión en el sistema nervioso central y en un patrón punteado a lo largo de la pata (flechas magenta y verde, respectivamente), la tinción con DAPI facilita apreciar la morfología del embrión. (B) Se indican (flechas rojas) desde la Pata 1 hasta la pata 4, pequeños grupos de células expresando *ventral veinless*, en una posición aparentemente homóloga, a la a la que forma los primordios *bl* (*book lungs*), *tr* (*trachea*) y *sp* (*spinnerets*) en el abdomen. (B') Detalle de la expresión de *Pt-vvl* en la base de la pata.

Pt-vvl se expresa en el sistema nervioso, en los primordios de los pulmones en libro (*book lungs*), el primordio traqueal y las glándulas productoras de seda (*spinnerets*) localizados en el opistosoma, así como en un patrón punteado en los segmentos distales de las patas y en la base de las mismas (figura 35).

Pt-sna, se expresa en el sistema nervioso central, así como en algunas células de las patas y en la base de las mismas (figura 36). No es posible confirmar si existe una co-expresión entre *snail* y *ventral veinless* en la base de las patas, sin realizar una doble ARN *in situ*, *sna* + *vvl*.

El gen homeótico *Dfd*, en *P. tepidariorum*, se expresa en las patas incluyendo los grupos de células expresando *vvl*, mientras que *Scr*, se expresa desde L2 hasta L4 (Khadjeh et al., 2012). Será muy interesante comprobar en el futuro, si la reducción de la expresión de *ventral veinless* mediante ARN interferente, afecta al proceso de muda en arañas en correlación con la disminución de la expresión de genes relacionados con la síntesis de ecdisona, mediante RT-PCR en estadios post-embrionarios (Cheng et al., 2014; Danielsen et al., 2014). Sería interesante también, reducir la expresión de ambos genes homeóticos mediante RNAi, y comprobar la expresión de *vvl* en la base de la pata (asumiendo que no haya malformaciones en las mismas).

Aunque los datos son muy preliminares, la posibilidad de que el patrón de expresión de *ventral veinless* en la base de las patas represente a los precursores glandulares sería muy interesante ya que en otras especies de artrópodos como en los crustáceos (Franch-Marro et al., 2006) los órganos respiratorios se encuentran asociados a la pata. Dado que hemos propuesto que los órganos respiratorios y endocrinos tendrían su origen en un precursor ectodérmico común en otros artrópodos, quizás los precursores endocrinos de arañas se hubieran mantenido asociados a la base del primordio de pata, pudiendo ser esta una característica ancestral mantenida en quelicerados.

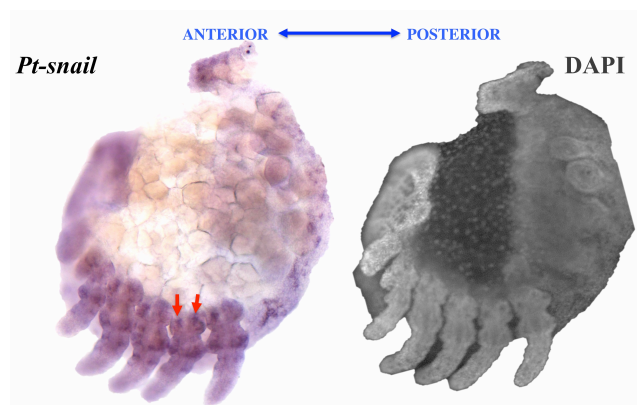


Figura 36. Expresión de *Pt-sna* en *Parasteatoda tepidariorum*. Se indica la expresión de dos grupos de células en la base de la pata (flechas rojas). Solamente una doble *in situ sna + vvl*, confirmaría que existe coexpresión.

6.2 Búsqueda los precursores endocrinos en *Strigamia maritima*

Strigamia maritima es un centípedo modelo para el estudio de la evolución de los mecanismos de desarrollo (figura 37). El subfilo (subtipo) Myriapoda constituye una ramificación basal dentro de los artrópodos mandibulados (figura 33). Este grupo contiene a miriapodos y centípedos que presentan un patrón corporal relativamente simple y con baja diversidad segmental, característica posiblemente ancestral (Brena and Akam, 2012).

Realizamos hibridación de ARN *in situ* para intentar identificar los primordios glandulares. Diseñamos sondas de ARN para los siguientes genes: *Sm-vvl*, *Sm-trh*, *Sm-svp*, *Sm-salm*, *Sm-jhamt2*, *Sm-jhe1* y *Sm-jamht3*, *Sm-neverland*, *Sm-snail1* y *Sm-snail3*. Se realizaron *in situ* entre los estadios 3.2 y 5 (figura 37). No estudiamos estadios mas tardíos debido a que, a partir del estadio 6 en adelante se genera un fondo de señal inespecífica, probablemente debido a la secreción de la cutícula en algunos segmentos. Las *in situs* para los genes involucrados en la síntesis de la hormona juvenil *jhamt2* y *jhe1*, no generaron señal detectable en los estadios estudiados.

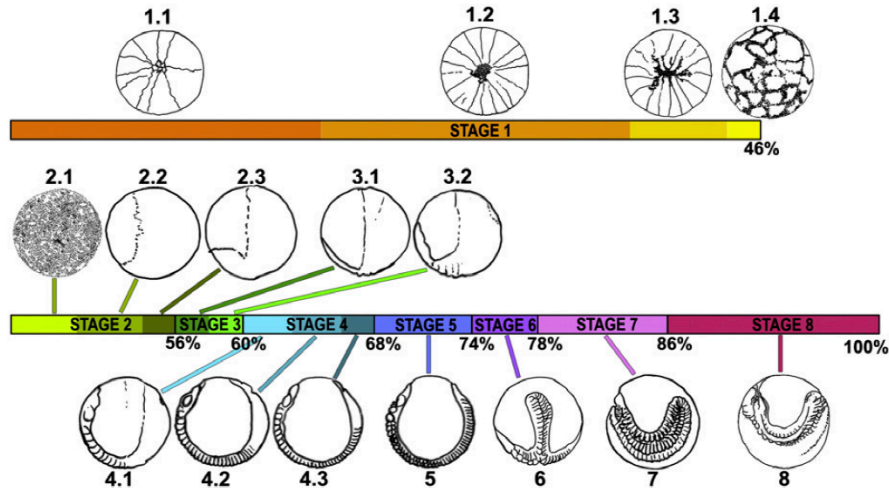


Figura 37. Fases del desarrollo embrionario de *Strigamia maritima*. Los embriones utilizados en este estudio fueron recolectados y fijados en Brora (Escocia), por miembros del laboratorio del Dr Michael Akam. Realizamos *in situs*, de embriones entre los estadios 3.2 y 5. Todas las representaciones son visiones laterales. Los diferentes colores de la barra de escala temporal, corresponden a los principales estadios del desarrollo embrionario. Adaptado de (Brena and Akam, 2012).

Neverland, implicado en la síntesis de la ecdisona, tampoco generó un patrón de expresión detectable. *Sm-trh*, la expresión de *trachealess* se detectó en un patrón repetitivo entre los surcos intersegmentales, en células del ectodermo dorsal. Este patrón va apareciendo a medida que se añaden los segmentos durante el desarrollo embrionario (Figura 38).

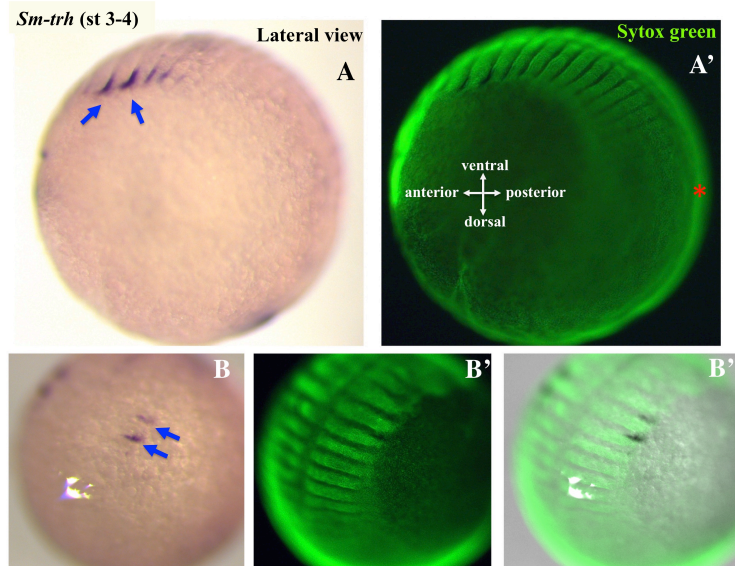


Figura 38. Expresión de *Sm-trachealess* en embriones tempranos de *Strigamia maritima*. (A-A') Visión lateral donde puede apreciarse la expresión de *trh* en los surcos intersegmentales torácicos (flechas azules), el asterisco rojo indica la región posterior del embrión donde todavía no ha comenzado la segmentación. (B-B'') Se aprecia que la expresión aparece primero en los segmentos torácicos anteriores y se activa posteriormente según maduran los segmentos. *Sytox green*, es un colorante nuclear.

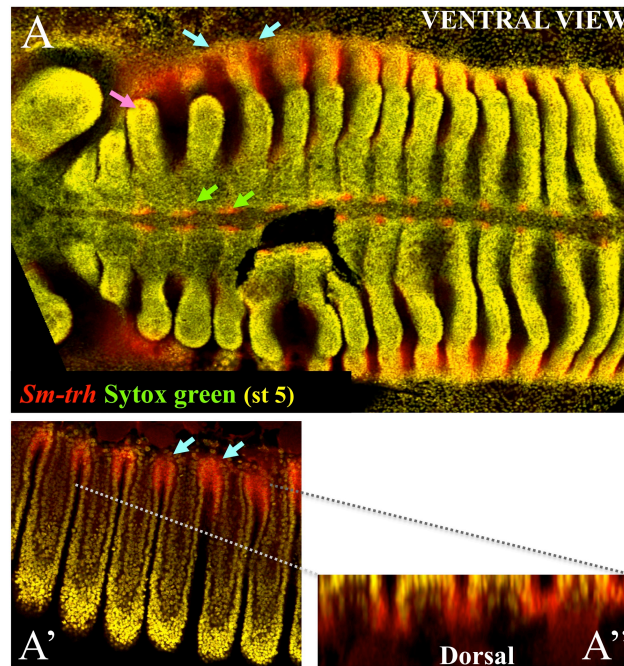


Figura 39. Expresión de *Sm-trachealess* en embriones tardíos de *Strigamia maritima*. (A) Embrión en estadio 5 visualizado en el microscopio confocal mostrando la expresión de *trh*. La sonda se detectó con el reactivo FastRed (SIGMAFAST™). Se observa que en este estadio la expresión se extiende hasta el segmento maxilar 2 (flecha magenta). (A'') Detalle de una proyección en el eje Z, donde se observa la expresión intersegmental. Desafortunadamente, los primordios traqueales no son reconocibles morfológicamente en este estadio para poder correlacionar la expresión de *trachealess* con la tráquea. Las flechas verdes en (A) señalan a la expresión que aparece en algunas células del sistema nervioso central.

Para tratar de identificar la morfología de las células que expresan *trachealess* se analizaron embriones en estadio 5 a los que se les eliminó vitelo y fueron extendidos durante la preparación de la muestra (Figura 39). Sin embargo, más allá de caracterizar con mayor detalle el patrón de expresión, no se pudo correlacionar la expresión de *Sm-trh* con la formación de la tráquea, ya que ésta solamente se visualiza a partir de un estadio 7 (Brena and Akam, 2012), cuando la secreción de la cutícula embrionaria impide detectar la expresión de genes mediante ARN *in situ*. Sólo la caracterización de la expresión de otros marcadores traqueales, junto estudios estructurales de microscopía electrónica, podría confirmar si las células que expresan *Sm-trh*, corresponden a los primordios traqueales en *Strigamia maritima*.

Ventral veinless (figura 40), no se expresa en st3-4, en las áreas en las que detectamos *trachealess*, generándose señal de fondo inespecífica en dichas áreas a partir de st 5 que podría deberse al inicio de la secreción de la cutícula o a una expresión ubicua del mismo en esa región. Sin embargo detectamos señal en el segmento mandibular (figura 40), donde *Dfd* se expresa a altos niveles (Brena&Akam, datos no publicados).

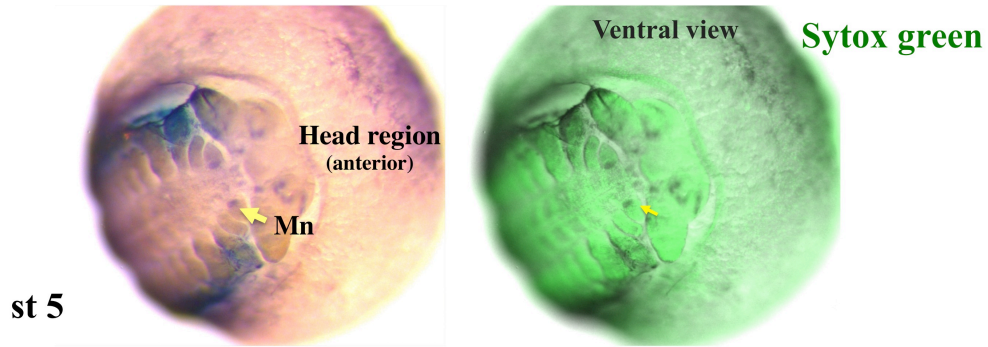
Sm-vvl

Figura 40. Expresión de *Sm-ventral veinless* en *Strigamia maritima*. (A) Se detectó expresión en pequeños grupos de células en el segmento mandibular. No se detectó un patrón segmentalmente repetido en estadios más tempranos, no pudiéndose testar la expresión más allá de un estadio 5, debido al depósito de la cutícula embrionaria.

Los transcritos de *salm* y *seven up* (figura 41), marcadores en *Drosophila melanogaster* de la glándula protorácica y del *corpora allata* respectivamente, presentan expresión en el segmento mandibular, así como en otras localizaciones a lo largo del tórax. Sería necesaria una doble *in situ salm* + *vvl* y *svp* + *vvl*, para confirmar la co-expresión de dichos marcadores, en lo que por ahora parecen ser los mejores candidatos a precursores endocrinos.

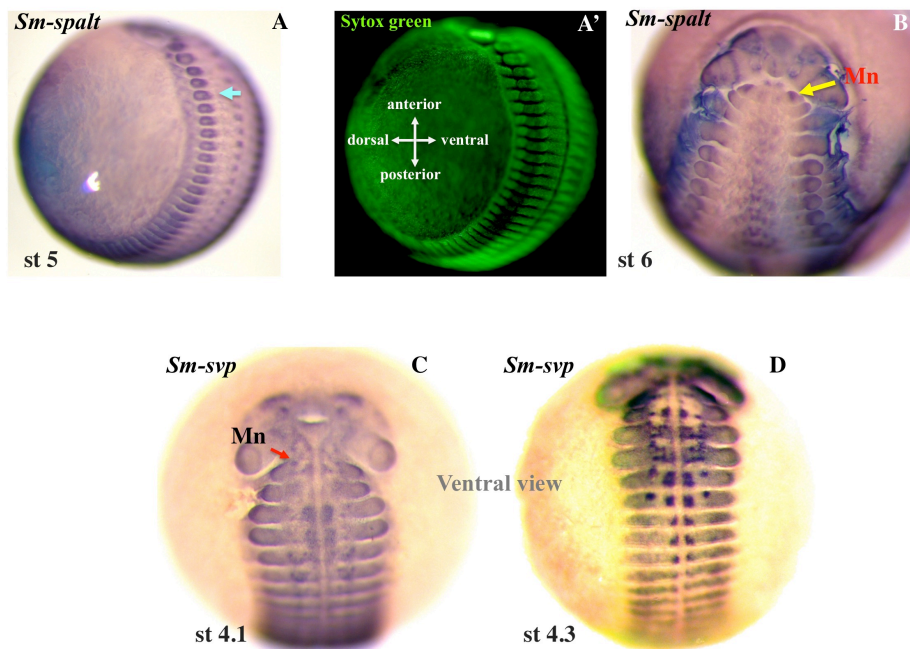


Figura 41. Expresión de *salm* y *svp* en *Strigamia maritima*. (A) Patrón de expresión de *Sm-salm* en una vista lateral, donde la flecha azul señala la expresión en los primordios de pata (B) Vista ventral, la flecha amarilla señala al segmento mandibular donde se detecta expresión de *salm* (C) Expresión de *svp* en el segmento mandibular. (D) patrón de expresión de *Sm-svp* en segmentos torácicos

Los genes *Sm-snail1* y *Sm-snail3*, ambos homólogos a *Dm-snail*, mostraron expresión solamente en el sistema nervioso central (Figura 41).

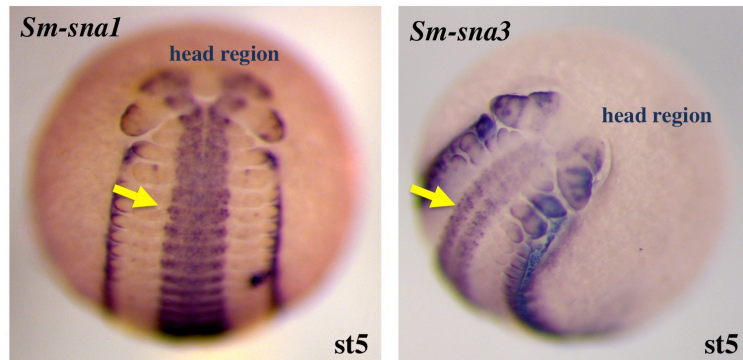


Figura 41. Expresión de *snail-1* y *snail-3* en *Strigamia maritima*. Expresión de *Sm-snail1* y *Sm-snail3*, en el sistema nervioso central.

Los datos presentados para *Strigamia maritima*, a pesar de ser muy preliminares, son compatibles con la posible contribución del segmento mandibular a la función endocrina.

Dada la limitación de técnicas de genética funcional aplicables en *Strigamia maritima*, los estudios ultraestructurales son indispensables. La identificación por microscopía electrónica de transmisión, de células con características glandulares en el segmento mandibular, ausentes en los segmentos torácicos, reforzaría la hipótesis del origen de los precursores endocrinos en este segmento. A pesar del carácter preliminar del trabajo presentado, proponemos, que el segmento mandibular de los miriápodos formaría los precursores de los órganos endocrinos, mientras que las patas de los quelicerados tendrían asociados los precursores de los órganos endocrinos (figura 42).

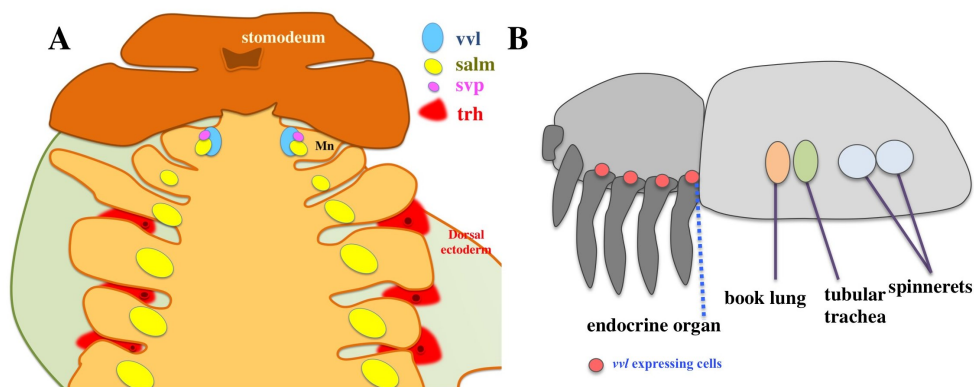
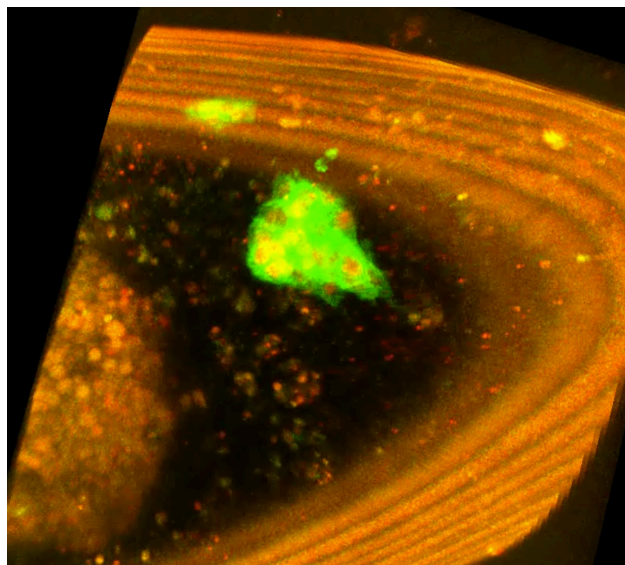
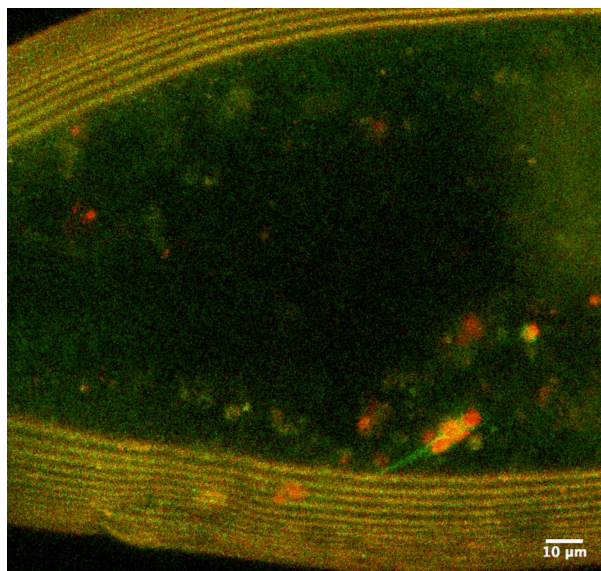


Figura 42. Modelo de localización de los órganos endocrinos y respiratorios en miriápodos y quelicerados. (A) Modelo de *S. maritima* donde un grupo de células *vvl* coexpresando, *svp* y/o *salm* serían los precursores endocrinos, mientras que los grupos de células que expresan *trh* en los surcos intersegmentales de los segmentos torácicos, invaginarían formando el árbol traqueal. (B) Modelo en *P. tepidariorum*, donde la base de las patas incluiría grupos de células que expresan *ventral veinless* y tendrían función endocrina.

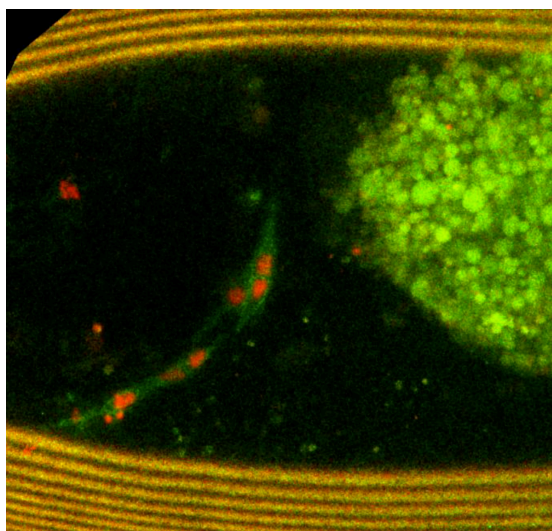
Videos suplementarios (apartados 4 y 5 de resultados suplementarios)



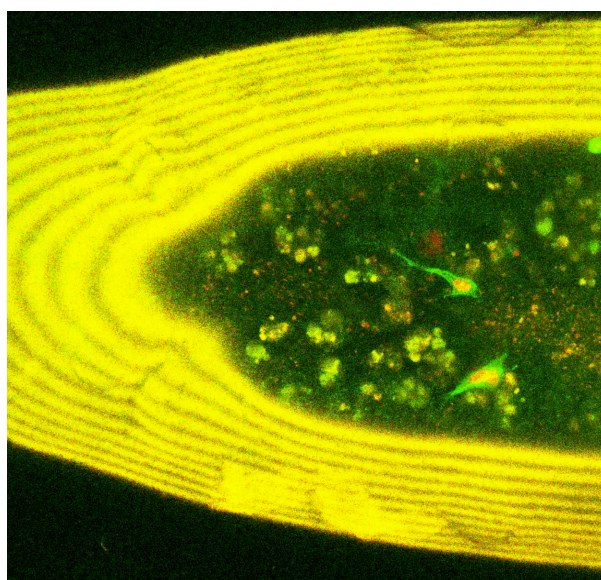
Video suplementario 1. Embrión silvestre, expresando bajo el control del *enhancer snail*-rg R2P2, el módulo **nRFPmGFP**, que marca las membranas con GFP y los nucleos con mCherry. El embrión tiene una posición dorso-lateral. Anterior se sitúa a la derecha. El video comienza en un st13.



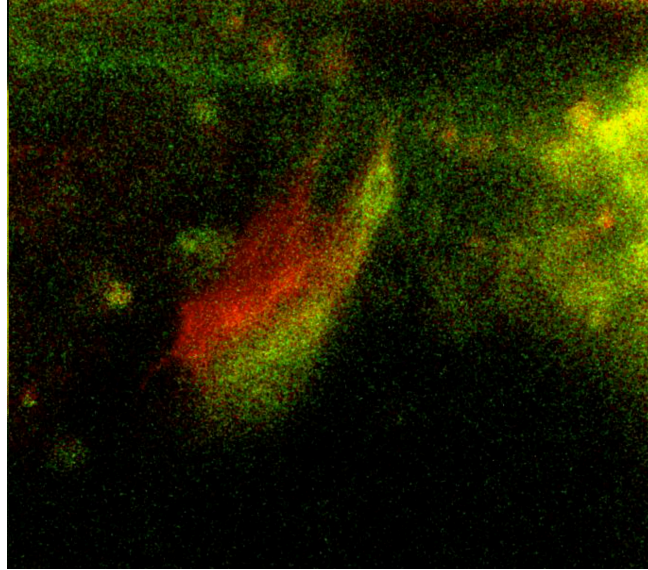
Video suplementario 2. Embrión donde se están induciendo deleciones somáticas del *enhancer* endógeno *snail*-rg R2 mediante el sistema CRISPR/Cas9 (material y métodos suplementarios; resultados suplementarios apartado 4). La células están marcadas por la expresión del módulo **nRFPmGFP** bajo el control del *enhancer snail*-rg R2P2. Se muestra una vista dorsal del embrión. Anterior se sitúa a la izquierda. El video comienza en un st13.



Video suplementario 3. Embrión donde se están induciendo deleciones somáticas del *enhancer* endógeno *snail*-rg R2 mediante el sistema CRISPR/Cas9 (material y métodos suplementarios; resultados suplementarios apartado 4). Las células están marcadas por la expresión del módulo **nRFPmGFP** bajo el control del *enhancer* *snail*-rg R2P2. Se muestra una vista lateral del embrión. Anterior se sitúa a la izquierda. El video comienza en un st12 tardío.



Video suplementario 4. Embrión donde se están induciendo deleciones somáticas del *enhancer* endógeno *snail*-rg R2 mediante el sistema CRISPR/Cas9 (material y métodos suplementarios; resultados suplementarios apartado 4). Las células están marcadas por la expresión del módulo **nRFPmGFP** bajo el control del *enhancer* *snail*-rg R2P2. Se muestra una vista dorsal del embrión. Anterior se sitúa a la izquierda. El video comienza en un st13.



Video suplementario 5. Embrión silvestre, donde el primordio del CA está marcado con GFP de membrana, cuya expresión es regulada por el *enhancer snail*-rg CA (resultados suplementarios, apartado 5), mientras que el primordio conjunto CA/GP, expresa mCherry bajo el control del *enhancer snail*-rg. Anterior se sitúa a la izquierda. El video comienza en un st13 y es una visión lateral.

DISCUSIÓN GENERAL

En este apartado discutiré de manera general las principales conclusiones sobre los artículos 1 y 2 presentados en la Sección de Publicaciones, integrando los resultados suplementarios presentados.

1. Origen embrionario del *corpora allata* y la glándula protorácica (artículo 1; Sección publicaciones)

Uno de los principales objetivos de esta tesis ha sido la caracterización del origen embrionario del *corpora allata* y la glándula protorácica de *D. melanogaster*, ambos componentes de la glándula anular.

A las seis horas de desarrollo (st 10) el gen *ventral veinless* presenta un patrón de expresión ectodérmico segmentalmente repetido, desde el segmento maxilar en la región cefálica del embrión hasta el noveno segmento abdominal, siendo esta expresión activada por el *enhancer*, *vv1+2* (Boube et al., 2000; Sotillos et al., 2010).

La expresión de proteínas estables como eGFP o mCherry, dirigidas por el *enhancer* *vv1+2* nos ha permitido descubrir el destino de las células que activan *vv1* en este momento del desarrollo. Mientras que las células que activan el *enhancer* *vv1+2* en segmentos torácicos y abdominales corresponden a los primordios ectodérmicos traqueales, en la maxila dan lugar al primordio del *corpora allata* y en el labio al de la glándula protorácica. Esta es la primera vez que se descubre el origen embrionario de estas dos importantes glándulas.

Para formar la glándula anular, los primordios endocrinos deben desplazarse desde la maxila y el labio hasta la región dorsal de A1, donde se unirán al *corpora cardiaca* de origen mesodérmico formando la glándula anular (Park et al., 2011).

La migración del CA y la GP requiere la inducción de una EMT por *snail*. Esta es una de las principales diferencias entre en el desarrollo temprano de las glándulas endocrinas ectodérmicas y las células ectodérmicas traqueales. La activación de *snail* en los precursores ectodérmicos del CA y la GP tiene lugar después de la activación de *vv1+2*, en un estadio 11. Identificamos el *enhancer* *snail-rg* que dirige la expresión de *snail* en los precursores endocrinos y, que se localiza entre los dos *enhancers* principales que dirigen la expresión de *snail* en el primordio del mesodermo. La existencia de un *enhancer* de *snail* para los primordios de las glándulas endocrinas independiente al del mesodermo, nos permitió estudiar la falta de función de *snail* en las glándulas sin afectar la función de *snail* en el mesodermo, utilizando una combinación de BACs con alelos mutantes nulos de *snail*. Más recientemente, hemos delecionado el *enhancer* *snail-rg* en el locus de *sna* mediante la técnica CRISPR generando el alelo *sna* ^{Δ rgR2} mostrando que este *enhancer* no es redundante y sólo afecta la función de *snail* en el CA y la GP.

La generación de un *reporter* que expresa eGFP bajo el control del *enhancer snail-rg*, nos permitió marcar específicamente los primordios del CA y la GP, mostrando que no todas las células *vv/1+2* de la maxila y el labio activan *snail* y experimentan una EMT. En el segmento maxilar únicamente las células *seven up (svp)*, mostrando que constituyen el primordio del CA. En el segmento labial son las células *vv/1+2* más dorsales las que activan *snail-rg* así como el marcador de GP especificación temprano *Spalt*, mostrando que constituyen el primordio de la GP.

Las células *vv/1+2* de los segmentos maxilar y labial que no activan *snail-rg*, se fusionan y contribuyen a formar lo que hemos identificado como el tentorio, una estructura endoesquelética presente la cabeza de insectos (datos no publicados).

La formación del CA, la GP y las tráqueas en posiciones segmentales homólogas a lo largo del eje antero-posterior del embrión; la capacidad de transformar glándulas en tráqueas y viceversa; y la regulación genética común del gen *vv/* a través del mismo *enhancer vv/1+2* por genes Hox y la ruta señalización JAK/STAT, nos lleva a proponer una relación evolutiva entre precursores endocrinos y respiratorios.

Hipotetizamos que el precursor de los artrópodos era un animal segmentado que posiblemente respiraba a través del ectodermo. La evolución del exoesqueleto en los artrópodos requirió varias innovaciones. Primero se tuvieron que generar órganos respiratorios especializados y segundo se tuvo que crear un sistema eficiente para regular la muda y permitir el crecimiento. Proponemos que un órgano homólogo repetido en todos los segmentos de este animal primitivo divergió en los distintos segmentos para crear la glándula protorácica, el *corpora allata* y las tráqueas. Esta relación evolutiva no había sido identificada previamente debido a la extrema divergencia morfológica y funcional entre los órganos endocrinos y respiratorios.

Aunque los genes Hox regulan un programa genético común subyacente (representado por la activación de *vv/*) en el precursor ectodérmico que da lugar a órganos endocrinos y respiratorios, los genes Hox también dirigen su divergencia activando distintos genes reguladores de eventos morfogenéticos específicos de cada órgano. Los genes Hox cefálicos *Dfd* y *Scr*, regulan el proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT) en las células *ventral veinless* de la región cefálica, activando la expresión del inductor de EMT, *snail* (Thiery et al., 2009). De esta manera, los precursores endocrinos pierden sus características epiteliales e inician un proceso organogenético diferente al de la tráquea. En contraste, los Hox troncales, *Antp*, *Ubx*, *abd-A* y *Abd-B*, no activan *snail*, pero pueden activar uno de los principales reguladores del desarrollo traqueal, *trachealess* (Chung et al., 2011; Wilk et al., 1996). La activación diferencial de *snail* y *trachealess* por genes Hox cefálicos y troncales es la base para la divergencia de la red genética de los precursores homólogos.

La capacidad de transformación del precursor ectodérmico traqueal que expresa *ventra veinless* en glándulas, se observa cuando mediante la expresión ectópica de *Dfd* o *Scr* en el tronco, se activa la expresión de *snail* y se induce una EMT en los primordios traqueales. La transformación opuesta de las células *vvl* de la región cefálica en tráquea se causa mediante la inducción de *trh* en los primordios glandulares tras la expresión ectópica de cualquier Hox troncal, reforzando la hipótesis de que glándulas y tráqueas son órganos homólogos.

La mayoría de los artrópodos actuales presentan un sistema respiratorio especializado, por ejemplo tráqueas en insectos o bránquias en crustáceos (Franch-Marro et al., 2006) y un control endocrino del crecimiento y muda del exoesqueleto (Hartenstein, 2006). Esto sugiere que la existencia de un sistema endocrino y respiratorio independientes, apareció en una especie ancestral común de los artrópodos actuales.

La formación de un órgano endocrino especializado probablemente centralizó la producción de hormonas que inicialmente estaría distribuida por varios tejidos. En *Drosophila* la enzima codificada por el gen *phantom* requerida para la formación de ecdisona se expresa en la GP a partir del *st13*, pero en embriones tempranos se expresa en todo el ectodermo (Warren et al., 2004).

Recientemente se ha demostrado que *ventral veinless* es un regulador de la expresión de enzimas clave en la síntesis de la ecdisona, la hormona que regula la muda y metamorfosis (Cheng et al., 2014; Danielsen et al., 2014). Cabe la posibilidad que *Vvl* reclutara la expresión de *phm* durante la evolución al primordio de la GP.

En artrópodos, la mayor similitud entre órganos endocrinos a la observada en insectos probablemente sea la existente en los crustáceos, ya que ambos subfilos comparten un ancestro común (Hilbrant et al., 2012). En distintas especies de crustáceos se han indentificado la existencia de glándulas endocrinas equivalentes a las de insectos, donde el CA, CC y GP corresponden respectivamente al órgano mandibular, el órgano pericárdico, y la glándula Y (Chang and O'Connor, 1977; Hartenstein, 2006). Hay que reseñar que las glándulas equivalentes en crustáceos se encuentran en posiciones cefálicas y son independientes indicando que la migración posterior-dorsal de los primordios y su fusión ha ocurrido en insectos. Estas modificaciones adquiridas durante la evolución podrían haberse debido al reclutamiento de *Sna* a los primordios glandulares lo que puede haber inducido el reposicionamiento de las glándulas en insectos.

Para estudiar si *Sna* tiene alguna función en la síntesis hormonal o si sólo se requiere para la migración organogenética, sería interesante realizar una hibridación de ARN *in situ* del gen *phantom* en embriones *sna^{ΔrgR2}* que carecen del *enhancer snail-rg* (con bloqueo de la apoptosis) para comprobar si el primordio de la glándula protorácica que se mantiene integrado en el ectodermo, expresa el ARN de una enzima de la vía de síntesis de la ecdisona.

Si este fuera el caso, indicaría que el reclutamiento de *snail* en los primordios endocrinos para experimentar una EMT puede ser una característica de los artrópodos más modernos, no necesaria para la función endocrina, sino relacionada con el reposicionamiento de la glándula junto a la salida de la aorta en una localización óptima para la distribución homogénea de las hormonas en la hemolinfa. En relación a este punto, hemos visto casos en que a pesar de que la glándula no alcanza la posición normal (como en la ablación de la aorta; sección publicaciones, artículo 2), la GP mantiene la expresión de *phantom*.

En esta tesis hemos identificado varios genes que son fundamentales para la formación de las glándulas de *Drosophila*. Estos genes podrían utilizarse como marcadores genéticos para la identificación de los precursores endocrinos en otras especies de artrópodos. Esto sería especialmente interesante en organismos en los que no se conoce dónde están localizadas las glándulas o si existen glándulas especializadas. Un análisis comparativo nos permitiría inferir cómo pudo ser la organización corporal de un artrópodo ancestral.

Tanto en crustáceos como en insectos, los segmentos cefálicos forman las glándulas endocrinas, mientras que torácicos y abdominales darían lugar a órganos respiratorios externos asociados a las patas (branquias). En algunos artrópodos se ha mostrado que las tráqueas y las branquias son órganos homólogos ya que expresan tanto *vvf* como *trh* (Franch-Marro et al., 2006; Hartenstein, 2006).

Aunque muy preliminares, nuestros estudios (capítulo 6; resultados suplementarios) con quelicerados los cuales constituyen el linaje que primero se diversificó en la base de los artrópodos (Damen et al., 2002; Fox, 2016; Hilbrant et al., 2012) podría situar el origen de las glándulas asociado a las patas. Esta hipótesis se basa en nuestra observación de grupos de células que expresan *vvf* en la base de las patas, y la expresión de los genes *Dfd* y *Scr* en dicha localización (Khadjeh et al., 2012).

Esta hipótesis adquiere un mayor sentido cuando consideramos la localización del órgano respiratorio de los crustáceos, las branquias, que expresan *vvf* y también se localizan en la base de las patas (Franch-Marro et al., 2006).

2. Regulación genética común y específica de un *enhancer* por genes Hox

Hemos demostrado que los genes Hox tienen una importante función en la formación de las glándulas endocrinas a través de la regulación de *sna* y *vvf*. El estudio de la regulación genética del elemento *cis*-regulador *vvf*1+2 (sección publicaciones, artículo1) muestra que, sorprendentemente, es activado por seis proteínas Hox muy distintas, constituyendo un buen ejemplo de un *enhancer* con regulación inespecífica de parálogo (Merabet and Mann, 2016).

Por el contrario, la activación del *enhancer snail*-rg únicamente por solo dos genes Hox anteriores, constituye un caso de regulación semi-específica de parálogo en el que los genes Hox restringen un evento morfogénico a una determinada localización en el embrión.

Desde un punto de vista molecular, el estudio de *vv/1+2* es interesante para comprender cómo un mismo *enhancer* es capaz de integrar información de proteínas Hox con diferentes preferencias de unión al ADN (Slattery et al., 2011). Nuestros resultados preliminares (Sección 2; resultados suplementarios) muestran que mientras el *enhancer vv/1+2* puede ser activado por proteínas Hox troncales probablemente a través de múltiples sitios de unión monoméricos (entendiendo monoméricos como aquellos sitios que pueden unir Hox en ausencia del cofactor Exd), las proteínas Hox cefálicas *Dfd* y *Scr*, son dependientes de Exd, mediante su interacción con el *enhancer* principalmente a través de un sitio de unión de elevada afinidad Hox/Exd (Slattery et al; 2011). Si bien, dicho sitio de unión puede interactuar con proteínas Hox troncales, como *Ubx* en complejo con Exd, este sería de mayor importancia para la regulación por los Hox cefálicos, como demuestra que el fragmento *vv/miniS1+55* que elimina la mayor parte de los sitios monoméricos de *vv/1+2* pero incluye el sitio Hox1/Exd, es activado fundamentalmente en los dominios de expresión de *Dfd* y *Scr*.

Por otro lado, es interesante que mutaciones del sitio Hox1/Exd que incrementan la afinidad para genes Hox troncales, en base a datos de afinidad de unión *in vitro* (Slattery et al., 2011), expanden la expresión de *vv/miniS1+55* a segmentos troncales, incluso cuando dicho fragmento no incluye la mayor parte de los sitios Hox de unión monoméricos del fragmento *vv/1+2*. Esto abre la posibilidad de convertir el fragmento *vv/miniS1+55*, en cualquier tipo de *enhancer*. Esto es, existiría la posibilidad de diseñar mutaciones del sitio Hox1/Exd, para que el *enhancer* sea solo activado en una determinada localización, ya sea en la mandíbula (por *Labial*), en la maxila y el labio, (por *Dfd* y *Scr*) o en el tronco (por *Antp*, *Ubx*, *Abd-A*, *Abd-B*). De esta manera, el *enhancer vv/miniS1+55* ejemplificaría cómo la modulación del grado de afinidad de un único sitio Hox/Exd canónico permite restringir o expandir la expresión de un gen determinado a lo largo del eje antero-posterior al modificar su interacción con distintos parálogos Hox, lo cual resuelve la paradoja de especificidad Hox.

Este mecanismo de regulación tendría la ventaja, de que la expansión o restricción de la expresión de un gen regulado por proteínas Hox, se consigue con un número limitado de mutaciones que afectan a la preferencia de unión, sin la necesidad de modificar otros elementos reguladores de la expresión (vías de señalización, genes de segmentación, etc) que serían constantes en todos los segmentos. Experimentación bioquímica y genética adicional, permitirá comprender en profundidad la regulación de *vv/1+2* como un ejemplo representativo de regulación Hox inespecífica de parálogo (Merabet&Mann., 2016).

Desde un punto de vista evolutivo, la modulación de la preferencia de unión al ADN por reguladores antero-posteriores, sería un mecanismo para expandir o restringir la formación de un órgano. Cabe pensar, que originalmente, la expresión ancestral de *ventral veinless* en el precursor ectodérmico que dió lugar a órganos respiratorios y endocrinos, pudo expandirse a otro segmentos, donde se expresaría una proteína Hox que previamente no regulaba la expresión de *vvl*, incorporando nuevos sitios de unión de mayor afinidad para dicha proteína Hox o modificando, la de sitios de unión ya existentes.

Respecto al *enhancer snail-rg*R2P2, los datos generados hasta el momento sobre su regulación directa por genes Hox son mucho más limitados. Los algoritmos de predicción, identifican un sitio de unión Hox/Exd de baja afinidad para Dfd/Scr pero elevada especificidad ya que la preferencia de unión de Hox troncales por este sitio es muy reducida. La presencia de dicho sitio de unión, podría contribuir a explicar la regulación específica por Hox cefálicos. No obstante, existen muchos sitios de unión monoméricos predichos en *snail-rg*R2P2, para Hox troncales, así como otros sitios Hox/Exd de similar afinidad para Hox cefálicos y troncales (comunicación personal del Dr Bussemaker). Esto nos lleva a plantear la posibilidad de que proteínas Hox troncales interaccionen *in vivo* con el *enhancer snail-rg* R2P2 previniendo su activación, directamente o conjuntamente con co-represores.

A favor de esta posibilidad, nuestros resultados (sección publicaciones, artículo 1), muestran que el máximo grado de activación ectópica del *enhancer snail-rg* cuando sobreexpresamos Dfd a lo largo del ectodermo, se alcanza con la co-sobreexpresión de Spalt. Spalt es un represor de la expresión de Ubx en la zona cefálica (Casanova, 1989), por tanto, podría interferir en el tronco con la represión por Hox troncales y permitir la activación de *snail* a través del Hox activador cefálico cuya expresión se ha expandido en el ectodermo. Expresado en diferentes términos, la activación de *snail* en el tronco, implicaría la presencia del Hox cefálico activador y de Sal, que reprime la expresión de Hox troncales (*Antp*, *Ubx*, *Abd-A*, *Abd-B*) en la cabeza, que actuarían como represores de *snail-rg*. Por esta razón, la expresión de *snail-rg* no se expandiría en un mutante *Antp Ubx abd-A Abd-B*, pues se requiere la expresión de Dfd, que activaría el *enhancer* a través de sitios específicos en complejo con Exd/Hth, o bien interaccionaría con los mismos sitios de unión que proteínas troncales en complejo con Exd/Hth.

Una manera de testar la hipótesis de represión directa de *snail-rg* por Hox troncales sería sobreexpresar Dfd a lo largo del ectodermo en mutantes *Antp Ubx abd-A Abd-B*, comparando si existen mayores niveles de activación respecto a la sobreexpresión de Dfd en un fondo silvestre. La mutagénesis del sitio Hox3/Exd, será básica para conocer su contribución a la regulación específica por Dfd y Scr.

3. Migración celular colectiva de los precursores de la glándula anular.

Presentamos la glándula anular de *Drosophila*, como un nuevo modelo para el estudio de migración celular colectiva.

La migración del CA y la GP sigue una compleja ruta atravesando un ambiente tisular heterogéneo y altamente dinámico debido a movimientos morfogenéticos como el cierre dorsal del embrión y el movimiento de involución de la cabeza.

Hemos demostrado que tras la EMT, los precursores endocrinos migran una larga distancia desde posiciones ventrales siguiendo una ruta estable contactando con tejidos diana cercanos (sección publicaciones, artículo 2). Si nos centramos en el primordio del CA formado en la maxila, la diana más próxima es el primordio de la GP en el labio, la siguiente diana sería la rama traqueal cerebral y finalmente el primordio de la aorta. La aorta es la diana principal de las células glandulares y representa la única referencia que tienen para alcanzar posiciones dorsales. Las dianas intermedias, no son indispensables, pero actúan como sustratos que facilitan la migración.

Una vez conocida la ruta de migración del CA y la GP, nos planteamos cómo reconocen los precursores endocrinos a sus dianas. Para nuestra sorpresa, nuestros análisis preliminares no ofrecen evidencia de que vías de señalización como Dpp, FGF, EGF, PVF y Notch, estén directamente involucradas en la migración.

Una posible alternativa, es que la afinidad celular diferencial a través de moléculas de adhesión sea la base del reconocimiento de las dianas tisulares y por tanto de la migración dirigida de las glándulas. En esta visión, las células inicialmente producirían proyecciones de membrana aleatorias que se estabilizarían al contactar con dianas por las que presentan afinidad celular. De esta manera, interacciones adhesivas secuenciales entre las células endocrinas y sus dianas guiarían la migración colectiva. Experimentos con células tumorales muestran cómo proteínas de la matriz extracelular, tales como colágeno tipo IV, activan la capacidad migradora de células tumorales pancreáticas. También se ha propuesto que la afinidad particular de células tumorales hacia moléculas de la matriz extracelular presentes en una determinada localización podría explicar su invasión preferente (Ohlund et al., 2013; Ryschich et al., 2009).

De esta manera, componentes específicos de la matriz extracelular, directamente o después de ser procesados por proteasas extracelulares, podrían actuar como iniciadores de eventos de señalización, desencadenando reorganizaciones polarizadas del citoesqueleto (Berrier and Yamada, 2007; Lu et al., 2012). En nuestro modelo, esta posibilidad está respaldada por la existencia de moléculas de adhesión que se expresan específicamente en la rama cerebral o en la aorta. Por ejemplo, la Pericardina, un colágeno tipo IV, se expresa en las células pericárdicas del corazón y coordina el movimiento dorsal del mesodermo cardiaco (Chartier et al., 2002).

Recientemente se ha descrito que la proteasa extracelular, *lonely heart*, expresada en el mesodermo cardiaco, es esencial para el procesamiento de la Pericardina y la formación de una matriz extracelular funcional y específica en el corazón de la larva de *Drosophila* (Drechsler et al., 2013). Sería interesante sobreexpresar moléculas de adhesión específicas del corazón para ver su capacidad de redirigir la migración de los precursores endocrinos.

Por tanto, proponemos un modelo en el que los precursores endocrinos migran como grupos cohesivos de células, que se desplazan en base a migraciones a corta distancia hasta dianas tisulares por las que presentan afinidad celular, ya sea mediada por moléculas de adhesión célula-célula o por una matriz extracelular específica promoviendo la polarización de la migración del grupo.

Otra cuestión interesante es si en los primordios glandulares, al igual que ocurre en la tráquea, existen células migradoras especializadas y células seguidoras, o si por el contrario, todas las células tienen la capacidad de migrar. Los experimentos donde inducimos letalidad generalizada en el primordio glandular generando aleatoriamente deleciones somáticas del *enhancer snail-rg* (resultados suplementarios, sección 4) indican que todas las células supervivientes tienen capacidad migradora (videos suplementarios 2-4).

En estos experimentos observamos que, en deleciones aleatorias de *snail-rg* donde sobreviven pocas células, las células endocrinas intercambian posiciones deslizándose unas sobre las otras que actúan a modo de sustrato (video suplementario 3-4). Por tanto, cabe la posibilidad de que en primordios silvestres todas las células extiendan continuamente proyecciones de membrana para interactuar con las células adyacentes reordenando su posición en el primordio al encontrar tejidos diana sin que existan células guía.

Sin embargo, sugerimos dicha posibilidad con prudencia, ya que cabe la posibilidad de que el comportamiento celular observado en los casos de inducción de letalidad generalizada sea un artefacto. Pudiera ocurrir que, en un contexto silvestre, en el primordio CA/GP existan células guía especializadas que repriman la actividad migradora de las células vecinas y si estas murieran las células vecinas podrían convertirse en guía.

Para resolver este problema, serán muy informativos experimentos de microscopía confocal *in vivo*, marcando células individuales en un primordio silvestre.

Las imágenes de microscopía confocal de embriones silvestres con muestras fijadas e *in vivo* (figura 30, sección 5 de resultados suplementarios; video suplementario 5) donde marcamos con *sna-rg* CA-eGFP el primordio del CA y ambos primordios CA/GP con *sna-rg*-mCherry, nos permiten observar cómo las células del CA adelantan a la GP, deslizándose sobre la misma para, probablemente, interactuar con la aorta (no marcada). Parecen observarse también células líder llevando a cabo una migración activa en el primordio del CA (video suplementario 5).

Esto podría deberse no a un carácter especial de líder, sino a su mayor proximidad al primordio de la aorta con el que interaccionan y estabilizan proyecciones de membrana. No obstante, un mayor número de observaciones son necesarias para establecer observaciones concluyentes.

Tanto en el caso en el que marcamos únicamente un primordio endocrino (*snail-rg* CA) o ambos (*snail-rg*), el elevado número de células marcadas hace difícil diferenciar el comportamiento de células individuales y sus reordenamientos posicionales. Prevemos que el marcaje de una o un reducido grupo células utilizando la tecnología CRISPR en embriones silvestres (figuras 31-32, sección 5 de resultados suplementarios), nos permitirá analizar *in vivo*, las interacciones que existen en el primordio CA/GP durante la migración, esto es, si existen células líder y seguidoras, o si existe un primordio altamente dinámico donde las células continuamente intercambian su posición deslizándose unas sobre otras en un proceso de competición por la interacción con la principal diana tisular de los precursores endocrinos, el primordio de la aorta.

CONCLUSIONES GENERALES (Artículos 1 y 2)

1. Los primordios del *corpora allata* y de la glándula protorácica de *Drosophila* se especifican a las 6 horas de desarrollo en el segmento maxilar y labial, respectivamente.
2. El *corpora allata* y la glándula protorácica se especifican del ectodermo lateral en posiciones homólogas a las que se forma la tráquea en segmentos posteriores.
3. Sal y Svp son marcadores tempranos específicos de la GP y el CA respectivamente.
4. La tráquea y los primordios glandulares expresan *vvl*, activado a través del *enhancer vvl1+2* regulado por genes Hox y la vía JAK/STAT.
5. Los genes Hox *Dfd*, *Scr*, *Antp*, *Ubx*, *abd-A* y *Abd-B* regulan de manera común la activación de *vvl* en los primordios ectodérmicos endocrinos y respiratorios a través del *enhancer vvl1+2*.
6. Los genes Hox troncales *Antp*, *Ubx*, *abd-A* y *Abd-B* pueden activar la expresión del principal regulador traqueal, *trachealess*.
7. Los genes Hox cefálicos *Dfd* y *Scr*, junto con la vía JAK/STAT, son requeridos para activar la expresión del inductor de EMT *snail* en el primordio del CA y la GP.
8. La activación de *snail* en los primordios del CA y la GP, se produce a través de un *enhancer* específico, *snail-rg*.
9. Snail se requiere para activar un proceso de EMT en el primordio del CA y la GP así como para su viabilidad celular.
10. Vvl se requiere para la migración de las glándulas, así como su supervivencia.
11. Los primordios traqueales se pueden transformar en glandulares y viceversa modulando la expresión de *Dfd/Scr* y Hox troncales respectivamente.
12. Los primordios traqueales y glandulares probablemente se originaron por un proceso de evolución divergente de un primordio segmentalmente repetido presente en un artrópodo primitivo.

13. Los primordios del *corpora allata* y la glándula protorácica, después de experimentar una EMT inducida por *snail*, se fusionan y migran colectivamente hasta posiciones dorsales en el primer segmento abdominal.
14. Tanto el primordio del CA como el de la GP pueden migrar independientemente hasta posiciones dorsales.
15. Los precursores del CA/GP, alcanzan posiciones dorsales mediante la interacción con el extremo más anterior del primordio de la aorta, localizado en T2.
16. La migración eficiente del primordio CA/GP hasta el primordio de la aorta, requiere la migración hasta dianas tisulares intermedias que actúan como un sustrato
17. Las dianas tisulares intermedias del CA, son la GP y la rama traqueal cerebral. En la GP, únicamente la rama cerebral traqueal.
18. Un primordio ectópico de CA puede sustituir a la GP en el segmento labial facilitando como sustrato intermedio con mutua afinidad celular, la migración hasta la aorta.
19. El ensamblaje de la glándula anular resulta de la fusión entre las células mesodérmicas del *corpora cardiaca* localizadas ventralmente a la aorta anterior con la glándula protorácica, seguido de la fusión de los primordios contralaterales del *corpora allata* que han continuado su migración dorsal rodeando el extremo anterior de la aorta.

MATERIAL Y MÉTODOS SUPLEMENTARIOS

- 1. ChIP-PCR de las proteínas Hox Deformed y Abdominal-B en cultivo de células S2 de *Drosophila melanogaster***
- 2. Mutagénesis dirigida de los *enhancers* *vv1+2* y *snail-rg***
- 3. Regulación genética de los *enhancers* *vv1+2* y *snail-rg***
- 4. Deleción del *enhancer* *snail-rg* mediante tecnología CRISPR**
- 5. Generación del minigen *vv1+2-Vvl:GFP*, *reporter* *vv1*-auto-mCherry y pCaSpeR eGFP:GAL4**
- 6. Generación de anticuerpo policlonal de *Dm*-Spalt**
- 7. Generación de sondas de ARN para hibridación *in situ* en embriones de *Parasteatoda tepidariorum* y *Strigamia maritima***
- 8. Ensayos de movilidad electroforética (EMSAs)**

1. ChIP-PCR de las proteínas Hox Dfd y Abd-B en cultivo de células de *Drosophila melanogaster*

La técnica de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP; *Chromatin Immunoprecipitation*) consiste en la utilización de anticuerpos que se unen a una determinada proteína que interacciona físicamente con el ADN para precipitarla junto al ADN al que se encuentra unida. Esto permite identificar la(s) región(es) genómica(s) con las que interacciona, ya sea mediante secuenciación global o mediante PCR si se está interesado en una región concreta (Carey et al., 2009). En esta tesis se analizó mediante ChIP-PCR la unión de Dfd y AbdB a la región genómica donde se localiza el *enhancer* *vv/1+2*.

Para realizar esta técnica, expresamos las proteínas Dfd y Abd-B unidas al epítipo HA (hemaglutinina) en células S2 de *Drosophila melanogaster* en cultivo y realizamos la inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) usando un anticuerpo anti-HA como se detalla a continuación.

Transfección de células S2 de *Drosophila melanogaster*

Se transfectaron diez millones de células S2 con 15 microgramos de ADN plasmídico total (*Effectene Transfection kit*; QIAGEN)

En la sobreexpresión de la proteína Dfd, se transfectaron 15 microgramos del vector pAC-*Dfd:HA* (cedido por Ingrid Lohmann), donde la proteína Deformed está fusionada al epítipo HA (hemaglutinina), y cuya expresión está dirigida por el promotor de la actina-5C.

En la sobreexpresión de la proteína AbdB, se transfectaron 7.5 microgramos del vector UAS-*AbdB:HA* (cedido por Yacine Graba) junto con 7.5 microgramos del vector pAC-Gal4.

Las células transfectadas fueron cultivadas en placas de *Petri* de diez centímetros de diámetro, con medio sin suero suplementado con Penicilina y Estreptomicina como agentes antibacteriano y antifúngico, respectivamente.

Las células para el protocolo de ChIP se cultivaron 72 horas a 25 grados.

Monitorización de la transfección de las células S2 por Western-Blot

1. Centrifugar 0,5 mL de cultivo a 3000 rpm/5'/4°C.
2. Descartar sobrenadante y añadir 1ml de PBS-1X frío estéril y centrifugar a 3000 rpm/5'/4°C. Descartar sobrenadante.
3. Resuspender la biomasa celular en tampón de carga para proteínas 2X y hervirlo durante 5 minutos. Congelar las muestras a -20°C para comprobar posteriormente mediante *western blot* la expresión de la proteína exógena en las células transfectadas. En el protocolo de *western blot* se utilizarán directamente entre 5 y 10 microlitros de la muestra transfectada en tampón de carga.

4. La detección de la proteína se realizó utilizando como anticuerpo primario, anti-HA *rat* (1:10000; *Abcam* ab9119) y anti-*rat* HRP como anticuerpo secundario (1:10000; *Abcam* ab97057).

Fijación de las células transfectadas y sonicación de la cromatina

5. Esta etapa tiene como objetivo estabilizar mediante fijación con formaldehído las interacciones entre las proteínas unidas al ADN genómico. Al cultivo restante, se añadieron 27 microlitros de formaldehído al 37%, por cada mililitro de cultivo (concentración final 1%). Dejar en agitación suave 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, añadir 100 microlitros de Glicina estéril 1,375M, por mililitro de cultivo. Agitar suavemente 5 minutos a temperatura ambiente.

6. Transferir las células fijadas a un tubo Falcon de 15 ml y centrifugar a 1500rpm/10min/4°C. Retirar el medio. Añadir 10 ml PBS-1X estéril frío. Centrifugar en las mismas condiciones. Repetir el lavado con PBS.

7. Resuspender la biomasa celular en tampón de lisis celular frío suplementado con inhibidores de proteasa e incubar en hielo diez minutos.

8. Centrifugar 10min/1000rpm/4°C. Retirar cuidadosamente el sobrenadante y resuspender el precipitado (*pellet*) nuclear en tampón de lisis nuclear suplementado con inhibidores de proteasa. Incubar diez minutos en hielo. Finalmente se transfiere todo el volumen a un *eppendorf* de 2mL.

9. Sonicar la cromatina manteniéndolo en todo momento las muestras en hielo. La sonicación se realizó en un baño sonicador conteniendo agua fría con hielo. Condiciones de sonicación para obtener un rango fragmentos de ADN genómico de tamaño entre 300-1000 pb:

15"ON + 15" OFF (15 repeticiones) a máxima intensidad (H)

10. Centrifugar las muestras sonicadas durante 15 minutos a 4°C a 13000 rpm. Transferir el sobrenadante (que contiene la cromatina) a un *eppendorf* de 1,5mL estéril y frío. Alicuotar una pequeña cantidad y medir la concentración de ADN en *nanodrop* (cromatina inmunoprecipitada) usando como blanco el tampón de lisis nuclear. El rango óptimo de concentración es superior a 750 ng/μl y una relación de absorbancias A260/280=1,4-1,6

Todas las muestras utilizadas en este estudio cumplieron con los rangos óptimos de calidad (concentración y pureza). El sobrenadante conteniendo la cromatina fue repartido en *eppendorfs* de 1.5 ml, conteniendo cada alícuota 100 microgramos de cromatina total. Las muestras fueron congeladas a -80°C. Una vez comprobado el éxito de la transfección de las células S2 mediante *western blot*, se continuó con el protocolo experimental de ChIP.

Inmunoprecipitación de la cromatina

11. Descongelar en hielo las muestras de cromatina (100 microgramos de cromatina total), diluir la muestra hasta un volumen final de 300 microlitros con tampón de dilución suplementado con inhibidores de proteasa. Añadir 50 microlitros de esferas de Agarosa proteína A/G (*Cell Signalling*) a cada muestra de cromatina e incubar a 4°C durante 1 hora con rotación. Este paso reducirá la unión inespecífica entre el ADN y las esferas de agarosa.

12. Centrifugar las muestras 5min/3500 rpm a 4°C y recuperar el sobrenadante. A continuación, añadir 5 microgramos de anticuerpo anti-HA *rat* (*Abcam* ab9119) para inmunoprecipitar la proteína de interés de la muestra transfectada, en este caso Dfd-HA o AbdB-HA. Incubar durante la noche a 4°C con rotación. Como control se usaron muestras de cromatina de células transfectadas a las cuales no se les añadió anticuerpo anti-HA.

13. Añadir a las muestras (control y experimento) 50 microlitros de esferas de agarosa proteína A/G (*Cell Signalling*) e incubar a 4°C con rotación durante 2 horas.

14. Lavado de las esferas de agarosa: se centrifugan las muestras a 4°C 3000rpm/2min. Se retira el sobrenadante con cuidado de no arrastrar esferas de agarosa y se añade 1ml de tampón de lavado. Se deja en rotación a temperatura ambiente durante diez minutos. A continuación, se centrifuga 3000rpm/2min a temperatura ambiente y se vuelve a añadir tampón de lavado incubando 10 minutos. Se procede con dos lavados más en las mismas condiciones hasta un total de cuatro lavados. Se darán un quinto y un sexto lavado, estos dos últimos con tampón TE, en las mismas condiciones.

15. Finalmente, se resuspenden las esferas de agarosa en 300 microlitros de tampón de elución suplementado con 1 µl de proteinasa K (20 µg/µl). Incubar las muestras 2 horas a 55°C y después incrementar la temperatura hasta 65°C, incubando las muestras durante la noche.

16. Durante las dos horas de incubación a 55°C del paso 15, se descongelarán en hielo las muestras de cromatina almacenadas a -80°C, las cuales serán utilizadas como *input* en el experimento. Se cuantificará mediante PCR (paso 18) la cromatina inmunoprecipitada en las muestras experimentales y control respecto a la cromatina total o *input* obtenida en el paso 10. Las alícuotas de cromatina total (100 µg) utilizadas como *input* se diluyen hasta los 300 microlitros con tampón de dilución y se incuban una hora a 4°C con esferas de agarosa proteína A/G con rotación. A continuación, se transfiere el sobrenadante a otro *ependorf*, añadiendo un microlitro de proteinasa K (20 µg/µl). Después, se incuba una hora a 55°C, incrementándose la temperatura hasta 65°C e incubando durante la noche.

17. Las muestras a 65°C, se centrifugaron a 13.500 rpm, recuperándose la misma cantidad de ADN, en las muestras ChIP experimento y control (se descartan las esferas de agarosa). Todas las muestras, así como el *input*, se purificaron mediante el kit con columnas de purificación de QIAGEN

(QIAquick® Gel extraction kit). El ADN se eluyó en todos los casos en 50 microlitros de agua ultrapura.

Cuantificación mediante PCR cuantitativa a tiempo real (ChIP-PCR)

18. La cromatina purificada de las muestras ChIP experimental y control, junto al *input*, fueron analizadas por PCR cuantitativa a tiempo real. Se cuantificó la cantidad de ADN recuperado mediante inmunoprecipitación con respecto al ADN total o *input*.

La totalidad del protocolo experimental de ChIP para *Dfd:HA* y *Abd-B:HA* se realizó dos veces de manera independiente, utilizándose estos datos para su representación estadística. Para cada duplicado del experimento, se realizaron 4 réplicas de PCR (figura 1).

Reacción de PCR cuantitativa:

Las reacciones de PCR cuantitativa a tiempo real se realizaron en un termociclador *Bio-Rad* CFX96.

En cada reacción de PCR se añadió:

2 microlitros de cromatina purificada (ChIP), 5 microlitros de *FastStart SYBR® Green Master Mix 2X (Roche)*, 0.3 microlitros de *mezcla de cebadores *Fwd* + *Rvs* (10 µM cada uno) y 2.7 microlitros de agua ultrapura.

*La pareja de cebadores utilizada para el análisis de precipitación del elemento *cis*-regulador *vv1+2*, tanto en el ChIP de *Dfd:HA* como *Abd-B:HA*, fue:

1. ***Fwd* qPCR *vv1+2*:** 5'-TATCCATTTCACTGTGTAGG-3'
2. ***Rvs* qPCR *vv1+2*:** 5'-TTTTACAGATTTACCCATA-3'

El porcentaje de cromatina recuperada tanto en el ChIP experimental como en el ChIP control fue calculado en base a la siguiente fórmula, donde el valor CT corresponde al ciclo de la PCR en el cual la señal de fluorescencia generada durante la reacción supera un umbral pre-establecido (Figura 1).

$$2^{CT_{INPUT} / 2^{CT_{ChIP \text{ (control o experimento)}}} * 100 = \text{porcentaje de Input recuperado}$$

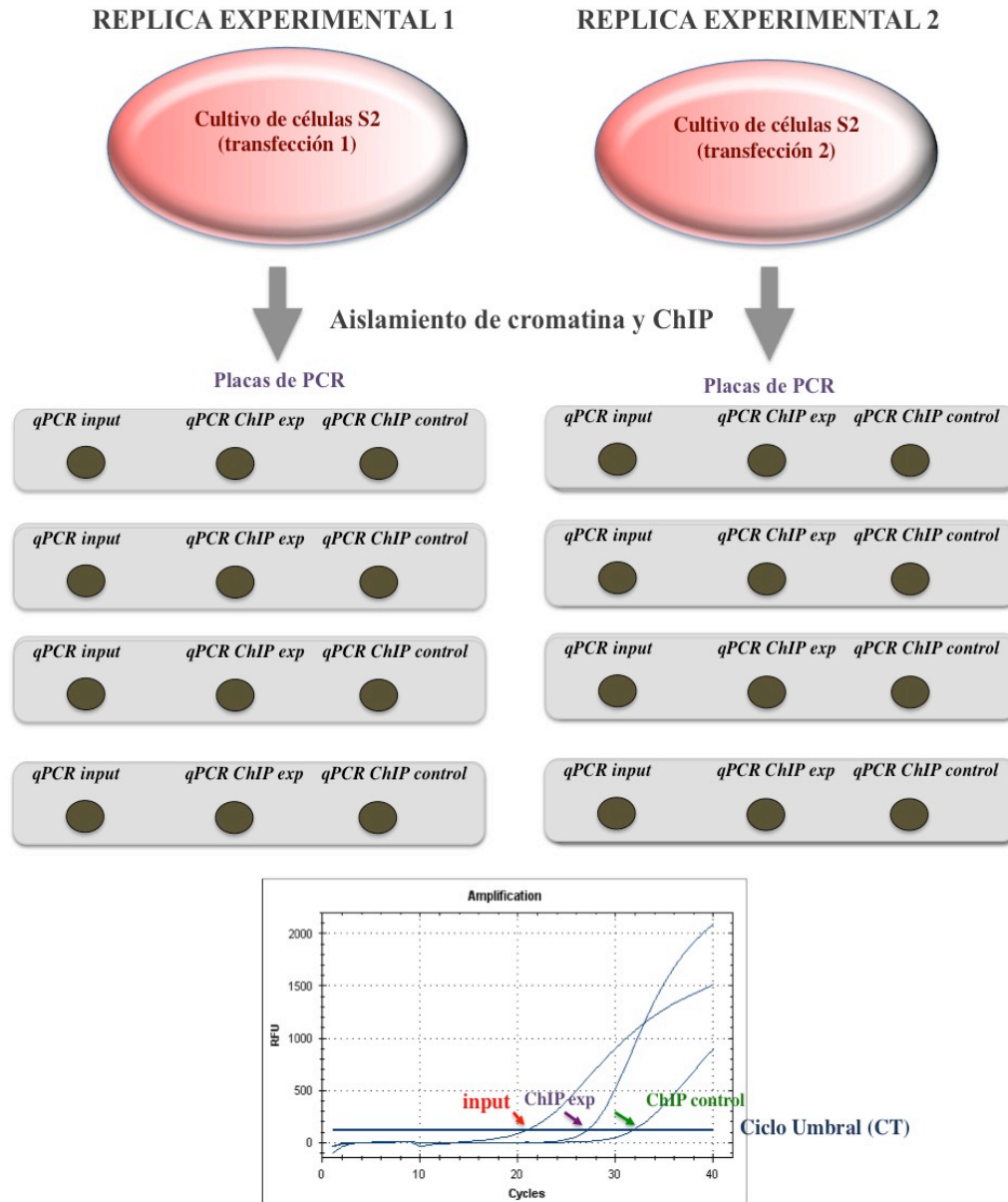


Figura 1. Esquema del protocolo experimental de ChIP. Una vez purificada la cromatina total y la resultante de los ChIPs control y experimental se llevan a cabo cuatro réplicas de las reacciones de PCR cuantitativa. El panel inferior muestra un ChIP de *AbdB:HA*. El valor de ciclo umbral es menor en la qPCR del *input* ya que existe mayor cantidad de ADN genómico y la intensidad de fluorescencia por encima del umbral pre-establecido se alcanza más rápidamente en la reacción de PCR. En el ChIP experimental, donde se inmunoprecipitó *AbdB:HA* existe una diferencia en su valor de ciclo umbral respecto al ChIP control, indicando que la proteína Abd-B se une a la región genómica que correspondería al elemento *cis*-regulador *vv11+2*, si bien, con esta técnica no se alcanza suficiente resolución para constatar el lugar exacto de unión al ADN.

Soluciones utilizadas en el protocolo experimental de ChIP:

Tampón de lisis celular

5 mM PIPES (pH 8.0)
85 mM KCl
0.5% Nonidet P-40 (NP-40)

Tampón de lisis nuclear

50 mM Tris-Cl (pH 8.0)
10 mM EDTA
1% SDS

Tampón de dilución

16.7 mM Tris-Cl (pH 8.0)
167 mM NaCl
1.2 mM EDTA
0.01% SDS
1.1% Triton X-100

Tampón de lavado

50 mM HEPES (pH 7.9)
500 mM NaCl
1 mM EDTA
0.1% SDS
1% Triton X-100
0.1% desoxicolato

Tampón TE

EDTA (0.5 M, pH 8.0)
Tris-Cl (1M, pH 8.0)
H₂O

2. Mutagénesis dirigida de los *enhancers* *vv1+2* y *snail*-rg

Mediante PCR se generaron distintas versiones mutadas y subdivisiones de los elementos *cis*-reguladores *vv1+2* y *snail*-rg (sección publicaciones; artículo1). Los *enhancers* se clonaron en el vector pCaSpeR-eGFP:PH para la generación de transgénicos. El esquema mostrado (figura 2) ilustra a modo de ejemplo cómo se generó el *enhancer* mutado *vv1+2 Hox1mut*. El resto de versiones mutadas y subdivisiones de los *enhancers* *vv1+2* y *snail*-rg fueron generadas de manera similar. En todas las reacciones de PCR, se utilizó la polimerasa de alta fidelidad *Phusion*[®] (NEB; M0530), así como el vector pGEMT[®]-easy como vector de clonación intermedio.

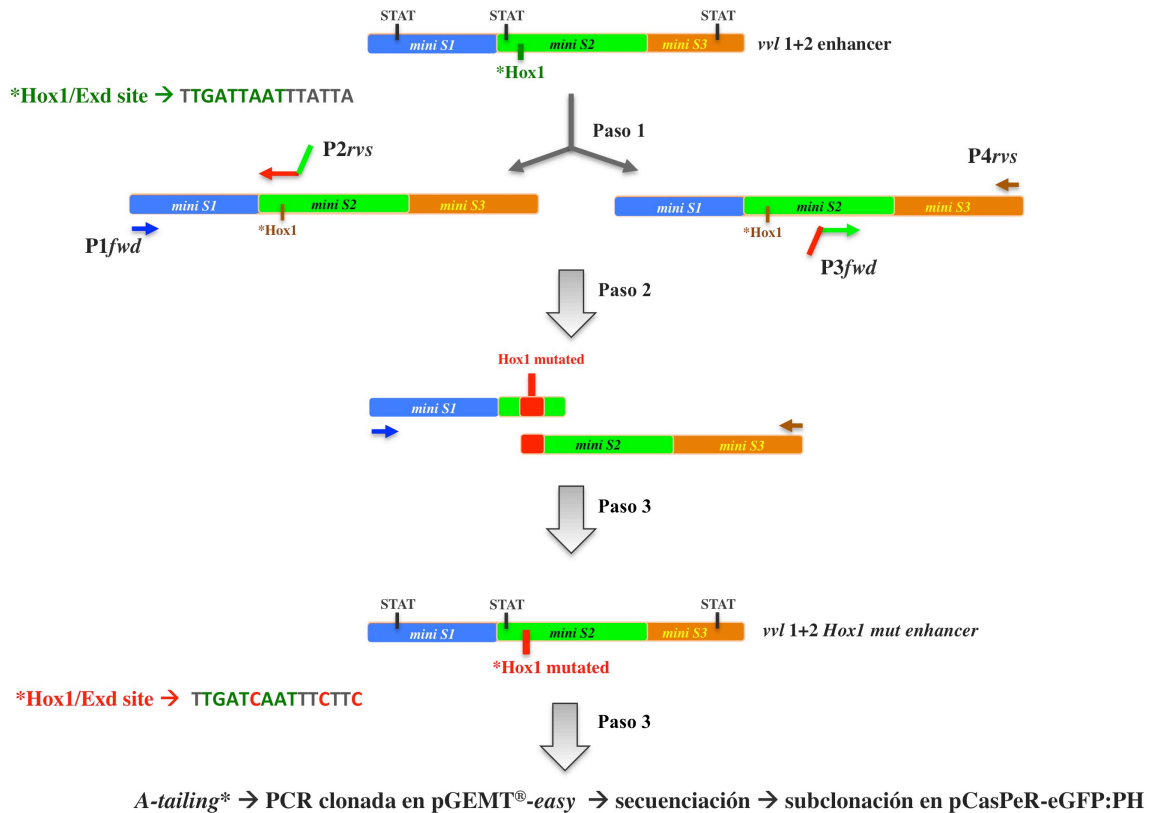


Figura 2. Ejemplo de mutagénesis dirigida. Esquema del proceso de mutagénesis dirigida y clonaje, llevado a cabo sobre el *enhancer* *vv1+2*. Primeramente, se realizan dos PCR independientes sobre el *enhancer* *vv1+2*, utilizando parejas de cebadores donde uno de ellos porta la mutación. Los cebadores P2rvs y P3fwd se diseñan para contener las mutaciones deseadas (línea de color rojo). Los dos productos de PCR generados tendrían un extremo solapante a través del cual, después de purificarlos y mezclarlos en una nueva reacción de PCR, hibridan, permitiendo amplificar la totalidad del *enhancer* *vv1+2* mutado usando los cebadores P1fwd + P4rvs (*overlapping* PCR). Las reacciones de PCR se realizaron con la polimerasa *Phusion*[®] de alta fidelidad que genera fragmentos con extremos romos. Para clonar el producto final de PCR en un vector, se realizó una reacción de *A-tailing*, donde el producto de PCR se incubó con *Taq* polimerasa (*GoTaq*[®]; Promega) en presencia de dATP, para incorporar dicho nucleótido al extremo 3'-OH del fragmento, permitiendo de esta manera clonar el amplicón de la PCR en el vector pGEMT[®]-easy, (vector comercial linearizado con extremos T salientes). Una vez secuenciado el fragmento clonado en pGEMT[®]-easy, se subclonó en el vector pCaSpeR-eGFP:PH de transgénesis para *Drosophila melanogaster*. Las mutagénesis de los *enhancers* *vv1+2* y *snail*-rg, consistieron en cambios de secuencia entre 1 y 3 pares de bases.

3. Regulación genética de los *enhancers* *vvl1+2* y *snail-rg*

En este apartado, se detallan los *stocks* de *Drosophila melanogaster* utilizados en la sección de resultados suplementarios. Todos los experimentos fueron realizados a 25°C:

1. UAS-*hh*, *patched*-gfp, *hh*-LacZ (cedidos por Fernando Casares), UAS-*wg* (cedido por Nan Hu), *hth*^{P2} (cedido por Yacine Graba), Df(2)5 *salm salr*, *snail-gfp* BAC (A. Stathopoulos), Df(3)*vvl4*.
2. Los siguientes *stocks* provienen de *Bloomington Stock Center*: *hh*^{AC}, UAS-*Scr*, UAS-*Salm*, *sal*-Gal4 459.2, *sna*¹, *vvl*^{GA3}.
3. Los siguientes *stocks* se hicieron en esta tesis: *sna-rg*-eGFP, *sna-rg*-mCherry, *vvl1+2*-mCherry, *arm*-Gal4; *vvl*-auto-mCherry y *vvl1+2*-Vvl:eGFP

4. Delección del *enhancer* *snail-rg* mediante tecnología CRISPR

La delección del *enhancer* *snail-rg*, mediante la técnica de CRISPR (Bassett et al., 2013; Port et al., 2014), constó de 3 etapas:

1. Clonación en tándem de dos gRNAs del *enhancer* *snail-rg* en el vector de inserción dirigida pCDF4 para su expresión en *D.melanogaster*, generando la cepa transgénica *snail-rg* gRNA(X2). El clonaje de los dos gRNAs se basó en un protocolo publicado (Port et al., 2014).

2. Inducción de delecciones en células somáticas o en la línea germinal de *Drosophila melanogaster* (figura 3), combinando las líneas *snail-rg* gRNA(X2) con *actin5C*-Cas9 o con *nos*-Cas9 (Port et al., 2014), esta última expresando la proteína Cas9 en la línea germinal (Van Doren et al., 1998).

3. Identificación y caracterización de las delecciones. Se utilizaron métodos genéticos y de biología molecular para comprobar las delecciones generadas (véanse figuras 3, 4 y 5).

Los siguientes sitios diana para *CRISPR*, fueron identificados utilizando la aplicación *on-line*:

CRISPR optimal target finder: <http://tools.flycrispr.molbio.wisc.edu/targetFinder>

gRNA *sna-rg* Upstream 5'-GTATAAAATAGTATTGGGTCTGG-3'

gRNA *sna-rg* Downstream 5'-GGGCAGGCCTGAGTCGACAAAGG-3'

La secuencia clonada se destacada en verde o en amarillo señalando el dominio **PAM** (*Protospacer Adjacent Motif*; nGG). La escisión del ADN genómico generada por la proteína Cas9 dirigida por ambos gRNAs, resultaría en una delección de aproximadamente 1.2 Kb, abarcando todo el *enhancer* *snail-rg* R2 (Resultados suplementarios, figura 13). El vector pCDF4 para expresar ambos gRNAs, fue inyectado en las líneas de inserción dirigida 25C (#B25709) y 68A (#B25710) a través del método estándar de integración *phiC31* (*Drosophila* Consolider-Ingenio 2007 Transformation platform, CBM-SO/ Universidad Autónoma de Madrid).

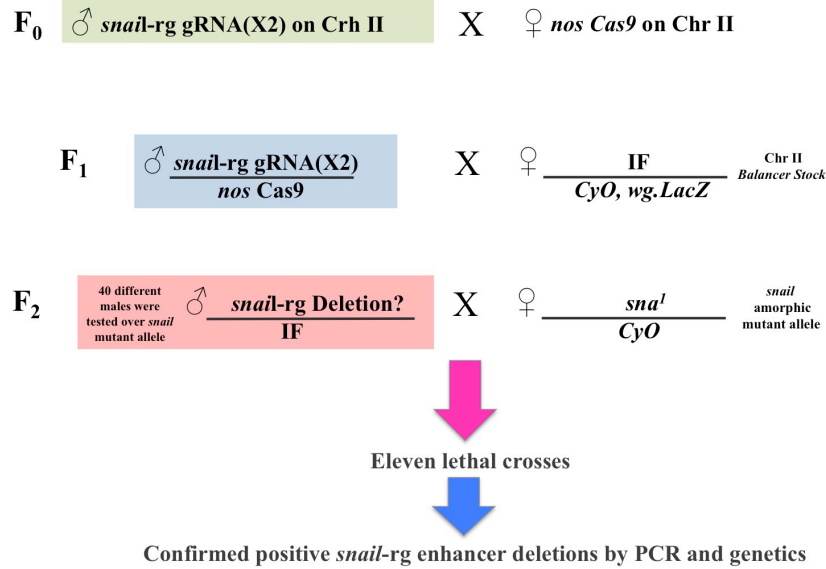


Figura 3. Delección del *enhancer snail-rg* en la línea germinal. Machos del *stock* transgénico que expresa ubicuamente los dos *sna-rg* gRNAs clonados en tándem, se cruzaron con hembras *nos*-Cas9 expresando Cas9 únicamente en la línea germinal (NIG-FLY#CAS-0001). Los machos de la F1 con posibles deleciones del *enhancer* en la línea germinal, fueron cruzados por hembras con un alelo nulo de *snail*. En total se llevaron a cabo 40 cruces con 40 machos independientes. La frecuencia de letalidad fue casi del 30%.

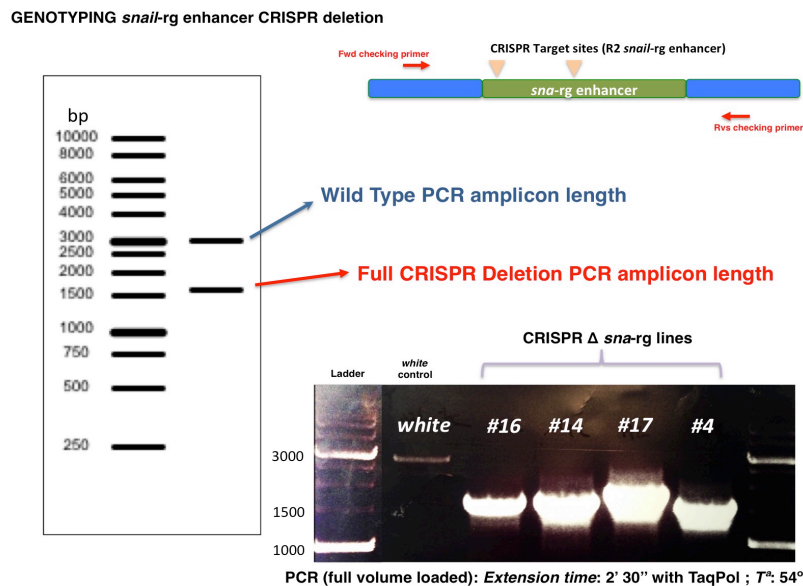


Figura 4. Comprobación de la delección del *enhancer snail-rg* por PCR. Se extrajo ADN genómico de la cabeza de moscas de cuatro *stocks* letales sobre el alelo amorfo *sna^l*, y por tanto, candidatos a portar la delección del *enhancer*. Se utilizó un protocolo de extracción de ADN por incubación con proteinasa K y resina Chelex®. Se diseñaron cebadores externos a la región a deleccionar. El tiempo de extensión de la PCR se optimizó para amplificar el tamaño del alelo deleccionado de menor tamaño. Todas las líneas testadas por PCR contenían la delección, ajustándose el tamaño de banda a la predicha. La línea #4 se estableció como *stock* para el estudio genético de la función de *snail* en la glándula anular (resultados suplementarios). El ADN control (moscas *white*) no amplificó el fragmento correspondiente a la delección, tan solo el tamaño de banda silvestre, *wild type*, pero en baja cantidad pues el tiempo de extensión no era el óptimo para ese tamaño de amplicón.

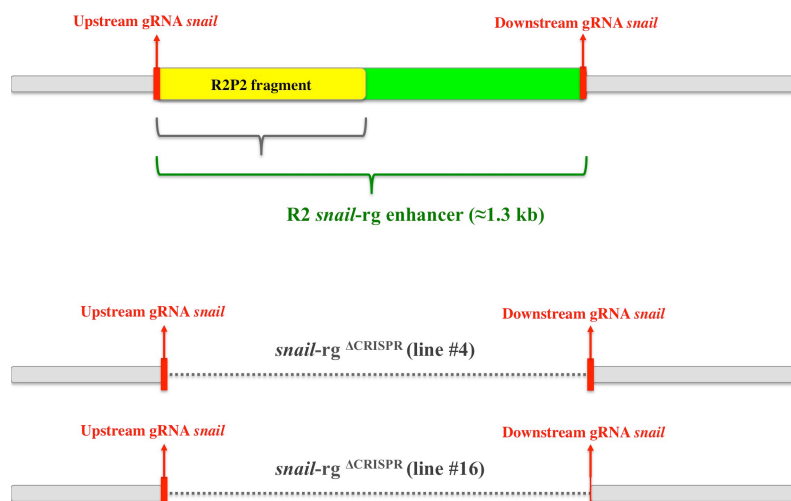


Figura 5. Comprobación de la delección del *enhancer snail-rg* por secuenciación. Se clonaron los productos de PCR cuyo tamaño correspondía a la delección del *enhancer sna-rg* R2, en el vector pGEMT-*easy*®. Para ello, se utilizó la polimerasa de alta fidelidad *Phusion*®, la pareja de cebadores externos utilizada para comprobar las delecciones por PCR (figura 3) y el ADN genómico de los *stocks* #4 y #16 (figura 3). La secuenciación reveló que el corte en el ADN tuvo lugar de manera muy precisa, dentro de la secuencia correspondiente a los *sna-rg* gRNAs, generando delecciones completas del *enhancer sna-rg* R2 (*sna-rg*^{ACRISPR}) para ambas líneas mutantes. La línea #4 se estableció como *stock* definitivo, denominándose *sna*^{ArgR2}, siendo este el utilizado en los experimentos genéticos mostrados en la sección de resultados suplementarios (figuras 27 y 28).

6. Generación del minigen *vv/1+2-Vvl:eGFP*, *pCaSpeR-eGFP:Gal4* y el *reporter vvl-auto-mCherry*

El clonaje del minigen *vv/1+2-Vvl:eGFP*, donde la expresión del factor de transcripción *ventral veinless* con una fusión N-terminal a eGFP está dirigida por el *enhancer vv/1+2*, se inició partiendo del vector intermedio, *pCaSpeR-polylinker* (sección publicaciones, artículo 1).

La secuencia codificante del gen *ventral veinless* (no contiene intrones) fue amplificada directamente de ADN genómico de *Drosophila melanogaster* utilizando una pareja de cebadores que contenían la secuencia de la enzima de restricción KpnI, así como la mezcla de polimerasas *Expand High Fidelity PCR System* (Roche), la cual incorpora dATP de la reacción al producto final de la PCR, permitiéndolo clonar en el vector pGEMT®-*easy*. Se comprobó mediante secuenciación estándar que la secuencia codificante de *ventral veinless* no contenía mutaciones.

Por otro lado, la secuencia codificante de eGFP clonada en el vector pCS2+, fue aislada mediante digestión BamHI + BglII y ligada con el vector *pCaSpeR-polylinker* previamente digerido con BamHI y desfosforilado mediante tratamiento con fosfatasa alcalina (inactivada a 75°C) generando el vector *pCaSpeR-eGFP-plk*. A continuación el vector *pCaSpeR-eGFP-plk*, que no contiene promotor, fue digerido con BamHI, desfosforilado y ligado con el promotor mínimo *hs43*, el cual había sido previamente digerido con BamHI + BglII y, purificado en un clonaje anterior (sección publicaciones; artículo1).

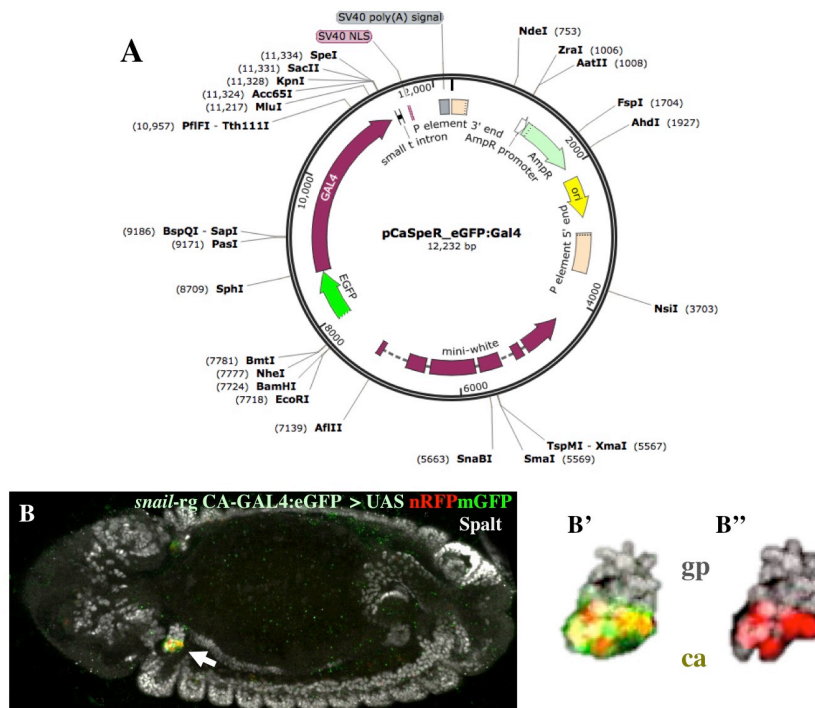


Figura 6. Mapa vector pCaSpeR Gal4:eGFP y línea transgénica. (A) Se representa el mapa genético del vector pCaSpeR Gal4:eGFP generado durante esta tesis. Las enzimas de restricción mostradas son de corte único. El sitio para la clonación de un *enhancer* es en las dianas BamHI o EcoRI. (B) Se muestra uno de los transgénicos generados utilizando el vector pCaSpeR Gal4:eGFP, donde se clonó el *enhancer* *snail-rg* CA, para dirigir la expresión génica a través del sistema Gal4/UAS, específicamente en el primordio del *corpora allata* (CA). En este caso se expresó la construcción UAS nRFPmGFP (flecha blanca; artículo 2., sección publicaciones). (B'-B'') Detalle del primordio del CA expresando GFP de membrana y RFP nuclear. La glándula protorácica está marcada con Sal.

A continuación, se subclonó el *enhancer* *vv1+2*, procedente del vector *vv1+2-pCaSpeR-eGFP:PH* (sección publicaciones, artículo 1) en el sitio de restricción EcoRI del vector *pCaSpeR-hs43-eGFP-plk*. Finalmente, el vector *vv1+2-pCaSpeR-hs43-eGFP-plk*, fue digerido con KpnI (diana de restricción incluida en el *polylinker* para clonar una proteína en fase con el eGFP), desfosforilado y ligado con la secuencia codificante de *ventral veinless*, aislada del vector pGEMT[®]-easy por digestión con KpnI, para generar finalmente, una vez comprobada la orientación correcta del inserto, el minigen *vv1+2-Vvl:eGFP*.

Adicionalmente, se clonó en el vector *pCaSpeR-hs43-eGFP-plk* la secuencia codificante de GAL4, generando el vector *pCaSpeR-GAL4:eGFP* (Figura 6). En el momento de escribir esta tesis se han clonado en este vector los *enhancers* *vv1+2*, *snail-rg* R2P2 y *snail-rg* CA, generándose los transgénicos correspondientes. El transgénico *snail-rg* CA-GAL4:eGFP, permitirá la expresión dirigida de genes específicamente en el primordio del CA (Figura 6). Hasta el momento, no se ha conseguido una herramienta genética que permita la ablación temprana del CA con el objetivo de estudiar su requerimiento fisiológico durante la vida larvaria, justo al finalizar la embriogénesis. Con *snail-rg* CA-GAL4:eGFP podremos expresar inductores de muerte celular con este propósito.

Por otro lado, el clonaje del *enhancer vvl*-autorregulador, previamente descrito (Certel et al., 1996) consistió en la amplificación de un fragmento de 0.62 kb mediante PCR (ADN genómico de *D. melanogaster*) con *cebadores que incorporaban la diana de restricción BamHI, purificación del producto de PCR, digestión con BamHI, y clonación en el sitio BamHI del vector pCaSpeR-mCherry:PH (sección publicaciones, artículo 1)

***Fwd vvl-auto:** 5'-AATGTGTGCCACTGTTTTT-3'

***Rvs vvl-auto:** 5'-GCATTGCTTAACCTCACTTTC-3'

7. Generación de anticuerpo policlonal de *Dm-Spalt* mayor

Se generó en conejo un anticuerpo policlonal para un fragmento de la proteína *Spalt* de *Drosophila melanogaster*. La purificación de un fragmento de la proteína *Spalt*, clonado en el vector pRSET1+2 (cedido por la Dra. Rosa Barrio), fue llevado a cabo con la ayuda de la unidad de proteómica del Centro Andaluz de Biología del Desarrollo. Una vez purificada la proteína, el servicio de inmunización animal del Animalario de la Universidad de Sevilla inyectó el antígeno en dos conejos.

Sobreexpresión de la proteína *Dm-Salm* en bacterias

El vector pRSET1+2 contiene un fragmento de *Salm* de 68KD aproximadamente, que incluye motivos dedos de zinc, fusionado a colas de Histidina. En primer lugar, se transformó la cepa bacteriana *E. coli* BL21 pLyS (resistente a Cloranfenicol; Chl) con el vector pRSET1+2:Salm (proporciona resistencia a ampicilina). La transformación bacteriana se realizó mediante el método TSS utilizando aproximadamente 100 microgramos de vector. La transformación bacteriana se sembró en placas de agar LB+Amp+Chl (34g/mL Chl).

Se inoculó una colonia transformante en 5ml de cultivo de LB + Amp + Chl, durante la noche, y se diluyó por la mañana cien veces, en 500 ml del mismo medio. El cultivo se incubó en agitación a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5. A continuación, para inducir la expresión de la proteína se añadió IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) hasta una concentración final de 0.5 mM. Después de la inducción, el cultivo permaneció 3 horas en incubación y se ultracentrifugó en recipientes de 250 mL a 8000 rpm/20min/4°. Tras lavarlo en tampón de resuspensión se volvió a centrifugar 10'/8000 rpm/4°, almacenándose la biomasa celular a -80° C.

Purificación de la proteína *Dm-Salm*

Se descongeló la biomasa celular en hielo y se resuspendió en 5 ml de Tampón de resuspensión (en tubo Falcon de 50ml), tras lo cual se sonicó durante 40 segundos (10"ON/10"OFF, a una intensidad del 50%). A continuación, se repartió el volumen en *ependorfs* de 1,5 ml y centrifugó a 13.000 rpm/10min/4°. El precipitado se resuspendió en Tampón lisis-aislamiento (5ml en total), y se unieron todas las alícuotas en un tubo Falcon

de 50 ml, sonicándose con las mismas condiciones indicadas anteriormente. Se repartió la solución nuevamente en *ependorfs* de 1,5 ml y centrifugó a 13.000 rpm/10min/4°. En este paso el sobrenadante contiene a elevadas concentraciones la proteína Spalt solubilizada desde los cuerpos de inclusión.

Se volvió a repetir el proceso de sonicación-centrifugación dos veces más, con el precipitado restante dando lugar a dos alícuotas adicionales de sobrenadante que también contendrán proteína solubilizada. Se mezclan todos los sobrenadantes y durante una hora, haciendo uso de una bomba peristáltica, se hacen circular por columnas de Níquel preequilibradas con tampón de lisis-aislamiento. Las colas de Histidina se unen al Níquel de la columna y de esta manera purificamos el fragmento de Spalt reduciendo los niveles de proteínas contaminantes.

Para eluir Spalt de la columna de Níquel usamos un equipo FPLC (ÄKTA Explorer; GE Healthcare). Ajustamos el equipo con Tampón de lisis-aislamiento, y eluimos Spalt con tampón de elución que contiene Imidazol. No se utilizó un gradiente de Imidazol para eluir la proteína, sino que se eluyó directamente a concentraciones 500 mM de Imidazol en fracciones de 1ml. Las fracciones que contenían los mayores niveles de proteína se inyectaron en un *cassette* de diálisis (*Slide-A-Lyzer 3500 MWCO*; Thermo Scientific). El *cassette* de diálisis se sumergió en 2L de tampón 1M UREA, 250 mM NaCl, Tris HCL 20mM, 85 mM Imidazol, durante 3 horas, con el objetivo de reducir la concentración de Urea e Imidazol, quedando la solución del interior del *cassete* a aproximadamente la misma concentración del tampón. Después, se transfirió el *cassette* de diálisis a una nueva cubeta con 2 litros de tampón Tris-HCl 20 mM, 100 mM NaCl, permaneciendo en agitación toda la noche. Al día siguiente, la solución en el interior del *cassete* de diálisis, sin Urea y sin Imidazol, presenta un precipitado blanco ya que el fragmento de *Salm* es insoluble en la ausencia de Urea. Se recogió con jeringa la mayor parte de la solución (aproximadamente 5 ml).

Se solubilizaron parcialmente los agregados de proteína añadiendo SDS hasta una concentración del 1%. Se cuantificó la concentración de proteína por métodos espectrofotométricos, así como directamente en un gel de acrilamida y tinción *comassie-blue*, por comparación con un patrón de concentraciones conocidas de la proteína BSA. La concentración de Proteína total obtenida fue aproximadamente de 1µg /µl.

Finalmente se aisló la proteína mediante electroforesis en gel de acrilamida, a partir de alícuotas de 500 µg de proteína (figura 7). Se realizó una tinción negativa, Zinc-Imidazol, que no fija las proteínas a la matriz de acrilamida del gel, lo cual permite liberar la proteína fácilmente en el animal. Se recortaron un total de 4 bandas correspondientes al fragmento de 68 KD de *Salm* (figura 7) lavando a continuación con tampón de electroforesis los fragmentos de proteína recortada. Finalmente se lavaron los fragmentos de proteína en acrilamida con agua ultrapura y se trituraron con la ayuda de una jeringa. Las cuatro alícuotas de 500 µg en un volumen de 500 µl aproximadamente se mandaron a inyectar en conejo.

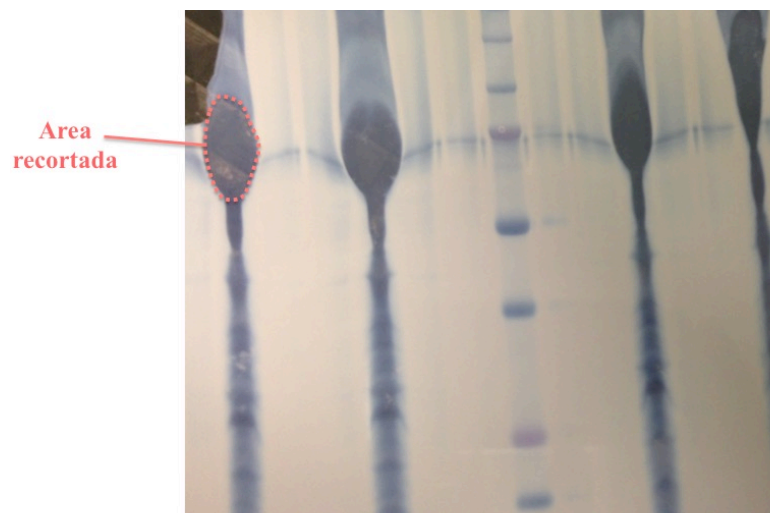


Figura 7. Purificación de *Dm-Salm*. La imagen muestra una tinción Zinc-Imidazol de un gel de acrilamida y la banda correspondiente al fragmento de 68KD de la proteína *Salm*, habiéndose cargado aproximadamente 500 microgramos de proteína purificada. Este paso final, además de contribuir al incremento de la purificación de la proteína (obsérvense bandas de otras proteínas contaminantes) favorece la inmunización del animal, ya que la acrilamida es un conocido agente co-adyuvante para la inmunización.

Soluciones utilizadas en el protocolo de purificación de *Dm-Salm*:

Tampón de resuspensión: Tris-HCl pH 8, 20 mM

Tampón de lisis-aislamiento: Urea 2M, Tris-HCl pH 8 20mM, TX-100 1%, 500 mM NaCl, 5mM Imidazol

Tampón de elución: Urea 2M, Tris-HCl pH 8 20mM, TX-100 1%, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol

Tampón de electroforesis proteínas: Tris-HCL pH 8.3, 190 mM Glicina, 0.1% SDS

8. Generación de sondas de ARN para protocolo de ARN *in situ* en embriones de *Parasteatoda tepidariorum* y *Strigamia maritima*

Se generaron sondas de ARN para genes de *Parasteatoda tepidariorum* (araña) y *Strigamia maritima* (ciempiés) homólogos a aquellos que son expresados en los precursores endocrinos de *Drosophila melanogaster*. Las sondas de ARN, se generaron directamente a partir de producto de PCR, sin necesidad de clonaje, utilizando cebadores con secuencias adaptadoras (figura 8).

Todas las sondas de ARN que se generaron (figura 8) durante la estancia de investigación en los laboratorios del Dr. Michael Akam (*Cambridge University*) y el Dr. Alistair MacGregor (*Oxford Brookes University*) fueron de la cadena *antisense* para testar la expresión del ARN mensajero de los genes de interés. Debido a la corta duración de la estancia no se generaron sondas tipo *sense* como control negativo de la expresión. Se realizaron los protocolos de hibridación *in situ*, previamente establecidos en los laboratorios donde se realizó la estancia.

El genoma de ambos organismos se encontraba secuenciado, por lo que las parejas de cebadores utilizadas se diseñaron en base a la secuencia de los genes que presentaban mayor homología con los de *D. melanogaster* por tBLASTn. La búsqueda de homología se basó en la transformación de la secuencia de una proteína de *Drosophila melanogaster*, a su secuencia nucleotídica (tBLASTn), para a continuación realizar una búsqueda de homólogos en el genoma *Parasteatoda* o *Strigamia*. A continuación, a la secuencia proteica del mejor candidato encontrado para un gen específico en el genoma de *Parasteatoda* y *Strigamia*, se le realiza de nuevo un tBLASTn contra el genoma de *Drosophila melanogaster* para confirmar la homología entre el gen candidato en las otras especies de artrópodos y el de *Drosophila melanogaster*.

9. Ensayos de movilidad electroforética (EMSAs)

Este apartado describe el protocolo que se realizó durante una estancia corta en el laboratorio del Dr. Richard Mann (Universidad de Columbia), de la técnica EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) para estudiar la interacción física entre proteínas Hox y sitios de unión presentes en los *enhancers* *vv1+2* y *snail*-rg (resultados suplementarios).

En primer lugar se purificaron las proteínas Hox, Ubx (Isoforma UbxIVa) y Dfd, clonadas en el vector de expresión en bacteria pET21b y pET14b respectivamente. Ambas proteínas estaban fusionadas a colas de histidina y se purificaron siguiendo un método muy similar al de purificación de Spalt (apartado 7) que incluyó sonicación del cultivo de bacteria (ambas proteínas se encuentran a elevadas concentraciones en la fracción soluble), aislamiento utilizando esferas de agarosa con Níquel, elución en un tampón con imidazol y diálisis final para eliminar el imidazol y dejar las proteínas purificadas en una solución con glicerol, preparadas para ser utilizadas en el protocolo de EMSA, en combinación con Exd-HM (purificada previamente de manera similar).

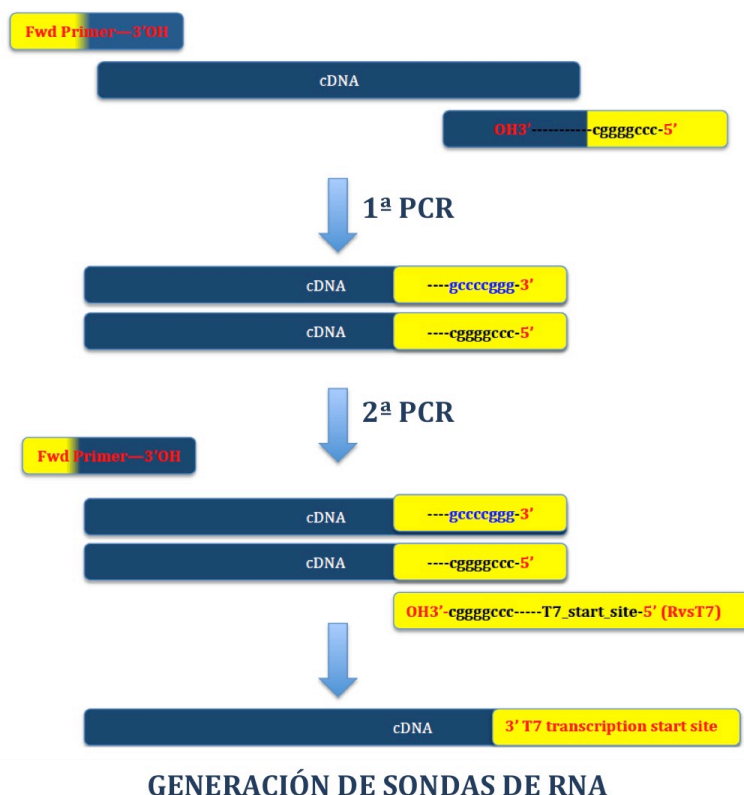


Figura 8. Generación de sondas de RNA utilizando producto de PCR como molde. Partiendo de una muestra de cDNA, tanto de *P.tepidariorum* como de *S.maritima*, se realizó una primera PCR con cebadores específicos para cada gen, donde el cebador *Rvs* incorpora además un adaptador para realizar la segunda PCR. Después de la primera PCR, se comprueba mediante electroforesis en gel de agarosa la presencia del producto de amplificación esperado y se utiliza esta PCR directamente como molde en una segunda ronda de PCR que incorpora en la mezcla de reacción el cebador *Fwd* de la anterior y un cebador *Rvs* universal (5'-agggatcctaatacgactcactatagggccccggggc-3'), que hibrida con la secuencia adaptadora e incorpora a su vez, la secuencia del promotor de la RNA polimerasa T7. El producto purificado de la segunda PCR se utiliza directamente como molde de ADN en la reacción de transcripción *in vitro* (*DIG RNA Labeling Kit*; Roche).

El protocolo de EMSA incluyó dos etapas básicas: (1) generación de la sonda radioactiva, (2) Incubación proteína-sonda, electroforesis y revelado.

8.1 Generación de la sonda radiactiva

En primer lugar se marcó radiativamente un oligonucleótido adaptador incubándolo con PNK (*T4 polynucleotide kinase*; *NEB*) y [γ - 32 P]ATP a 37 grados durante 15 minutos. El oligonucleótido adaptador no interacciona con ninguna proteína Hox.

Adaptador: 5'-GCTTTCGTTTCGTGCCT-3'

Por otro lado, se diseñaron oligonucleótidos que contenían las secuencias de unión predichas para proteínas Hox (secuencia indicada en figuras 10-11 y 17-18 de resultados suplementarios) los cuales incluyen la secuencia complementaria del oligonucleótido adaptador.

A continuación se hibridaron los oligonucleótidos que incluyen los sitios unión Hox, con el oligonucleótido adaptador marcado radiactivamente, y se incubó con ADN polimerasa I Klenow (*NEB*) 30 minutos a temperatura ambiente para generar la sonda radiactiva de ADN bicatenario definitiva, gracias a que el oligonucleótido adaptador actúa como cebador.

8.2 Incubación ADN-proteína, electroforesis y revelado

Se realizaron incubaciones entre las proteínas Hox purificadas y las sondas radiactivas. Se utilizaron dos concentraciones diferentes de proteína Hox en cada ensayo, una de 80 nM y otra mayor de 150 nM. La concentración utilizada de Exd-HM fue la misma en todos los casos, 150 nM. La concentración de sonda radiactiva fue la misma en todos los casos. Los complejos ADN-proteína se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente.

A continuación, se cargaron las muestras en un gel de acrilamida que no contenía agentes desnaturalizantes. Las muestras se corrieron durante 1 hora y media con un voltaje de 150V. Una vez terminada la electroforesis, el gel se deshidrata y se expone en un *cassette phosphor screen* (35X43 cm). La radiactividad de las bandas correspondientes a los complejos ADN-proteína, así como la sonda libre no unida, sensibiliza el *cassette*, de tal manera que cuando se retira el gel y se hace incidir sobre el *cassette* un láser, este emite una cantidad de luz proporcional a la cantidad de radioactividad recibida. Este último paso de escaneado se realizó en un equipo de imagen *Typhoon™ Imaging System*.

BIBLIOGRAFIA ADICIONAL

Abu-Shaar, M., Ryoo, H.D., Mann, R.S., 1999. Control of the nuclear localization of Extradenticle by competing nuclear import and export signals. *Genes Dev* 13, 935-945.

Anderson, M.G., Certel, S.J., Certel, K., Lee, T., Montell, D.J., Johnson, W.A., 1996. Function of the *Drosophila* POU domain transcription factor drifter as an upstream regulator of breathless receptor tyrosine kinase expression in developing trachea. *Development* 122, 4169-4178.

Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D.A., Horvath, P., 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315, 1709-1712.

Bassett, A.R., Tibbit, C., Ponting, C.P., Liu, J.L., 2013. Highly efficient targeted mutagenesis of *Drosophila* with the CRISPR/Cas9 system. *Cell Rep* 4, 220-228.

Berrier, A.L., Yamada, K.M., 2007. Cell-matrix adhesion. *J Cell Physiol* 213, 565-573.

Birukova, A.A., Tian, Y., Dubrovskiy, O., Zebda, N., Sarich, N., Tian, X., Wang, Y., Birukov, K.G., 2012. VE-cadherin trans-interactions modulate Rac activation and enhancement of lung endothelial barrier by iloprost. *J Cell Physiol* 227, 3405-3416.

Boube, M., Llimargas, M., Casanova, J., 2000. Cross-regulatory interactions among tracheal genes support a co-operative model for the induction of tracheal fates in the *Drosophila* embryo. *Mech Dev* 91, 271-278.

Brena, C., Akam, M., 2012. The embryonic development of the centipede *Strigamia maritima*. *Dev Biol* 363, 290-307.

Bronner, M.E., LeDouarin, N.M., 2012. Development and evolution of the neural crest: an overview. *Dev Biol* 366, 2-9.

Cai, D., Chen, S.C., Prasad, M., He, L., Wang, X., Choesmel-Cadamuro, V., Sawyer, J.K., Danuser, G., Montell, D.J., 2014. Mechanical feedback through E-cadherin promotes direction sensing during collective cell migration. *Cell* 157, 1146-1159.

Cai, D., Montell, D.J., 2014. Diverse and dynamic sources and sinks in gradient formation and directed migration. *Curr Opin Cell Biol* 30, 91-98.

Campbell, K., Casanova, J., 2016. A common framework for EMT and collective cell migration. *Development* 143, 4291-4300.

Campbell, K., Whissell, G., Franch-Marro, X., Batlle, E., Casanova, J., 2011. Specific GATA factors act as conserved inducers of an endodermal-EMT. *Dev Cell* 21, 1051-1061.

Carey, M.F., Peterson, C.L., Smale, S.T., 2009. Chromatin immunoprecipitation (ChIP). *Cold Spring Harb Protoc* 2009, pdb prot5279.

Casanova, J., 1989. Mutations in the *spalt* gene of *Drosophila* cause ectopic expression of *Ultrabithorax* and *Sex combs reduced*. *Roux Arch Dev Biol* 198, 137-140.

Caussinus, E., Colombelli, J., Affolter, M., 2008. Tip-cell migration controls stalk-cell intercalation during *Drosophila* tracheal tube elongation. *Curr Biol* 18, 1727-1734.

Certel, K., Anderson, M.G., Shrigley, R.J., Johnson, W.A., 1996. Distinct variant DNA-binding sites determine cell-specific autoregulated expression of the *Drosophila* POU domain transcription factor drifter in midline glia or trachea. *Mol Cell Biol* 16, 1813-1823.

- Chan, S.K., Jaffe, L., Capovilla, M., Botas, J., Mann, R.S., 1994. The DNA binding specificity of Ultrabithorax is modulated by cooperative interactions with extradenticle, another homeoprotein. *Cell* 78, 603-615.
- Chang, E.S., O'Connor, J.D., 1977. Secretion of alpha-ecdysone by crab Y-organs in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 615-618.
- Chartier, A., Zaffran, S., Astier, M., Semeriva, M., Gratecos, D., 2002. Pericardin, a Drosophila type IV collagen-like protein is involved in the morphogenesis and maintenance of the heart epithelium during dorsal ectoderm closure. *Development* 129, 3241-3253.
- Cheng, C., Ko, A., Chaieb, L., Koyama, T., Sarwar, P., Mirth, C.K., Smith, W.A., Suzuki, Y., 2014. The POU factor ventral veins lacking/Drifter directs the timing of metamorphosis through ecdysteroid and juvenile hormone signaling. *PLoS Genet* 10, e1004425.
- Chitnis, A.B., Nogare, D.D., Matsuda, M., 2012. Building the posterior lateral line system in zebrafish. *Dev Neurobiol* 72, 234-255.
- Choo, S.W., White, R., Russell, S., 2011. Genome-wide analysis of the binding of the Hox protein Ultrabithorax and the Hox cofactor Homothorax in Drosophila. *PLoS One* 6, e14778.
- Chung, S., Chavez, C., Andrew, D.J., 2011. Trachealess (Trh) regulates all tracheal genes during Drosophila embryogenesis. *Dev Biol* 360, 160-172.
- Clark, I.B., Muha, V., Klingseisen, A., Leptin, M., Muller, H.A., 2011. Fibroblast growth factor signalling controls successive cell behaviours during mesoderm layer formation in Drosophila. *Development* 138, 2705-2715.
- Crocker, J., Abe, N., Rinaldi, L., McGregor, A.P., Frankel, N., Wang, S., Alsawadi, A., Valenti, P., Plaza, S., Payre, F., Mann, R.S., Stern, D.L., 2015. Low affinity binding site clusters confer hox specificity and regulatory robustness. *Cell* 160, 191-203.
- Dalle Nogare, D., Somers, K., Rao, S., Matsuda, M., Reichman-Fried, M., Raz, E., Chitnis, A.B., 2014. Leading and trailing cells cooperate in collective migration of the zebrafish posterior lateral line primordium. *Development* 141, 3188-3196.
- Dambly-Chaudiere, C., Cubedo, N., Ghysen, A., 2007. Control of cell migration in the development of the posterior lateral line: antagonistic interactions between the chemokine receptors CXCR4 and CXCR7/RDC1. *BMC Dev Biol* 7, 23.
- Dambly-Chaudiere, C., Sapède, D., Soubiran, F., Decorde, K., Gompel, N., Ghysen, A., 2003. The lateral line of zebrafish: a model system for the analysis of morphogenesis and neural development in vertebrates. *Biol Cell* 95, 579-587.
- Damen, W.G., Saridaki, T., Averof, M., 2002. Diverse adaptations of an ancestral gill: a common evolutionary origin for wings, breathing organs, and spinnerets. *Curr Biol* 12, 1711-1716.
- Danielsen, E.T., Moeller, M.E., Dorry, E., Komura-Kawa, T., Fujimoto, Y., Troelsen, J.T., Herder, R., O'Connor, M.B., Niwa, R., Rewitz, K.F., 2014. Transcriptional control of steroid biosynthesis genes in the Drosophila prothoracic gland by ventral veins lacking and knirps. *PLoS Genet* 10, e1004343.
- De Velasco, B., Shen, J., Go, S., Hartenstein, V., 2004. Embryonic development of the Drosophila corpus cardiacum, a neuroendocrine gland with similarity to the vertebrate pituitary, is controlled by sine oculis and glass. *Dev Biol* 274, 280-294.
- Dona, E., Barry, J.D., Valentin, G., Quirin, C., Khmelinskii, A., Kunze, A., Durdu, S., Newton, L.R., Fernandez-Minan, A., Huber, W., Knop, M., Gilmour, D., 2013. Directional tissue migration through a self-generated chemokine gradient. *Nature* 503, 285-289.

- Drechsler, M., Schmidt, A.C., Meyer, H., Paululat, A., 2013. The conserved ADAMTS-like protein lonely heart mediates matrix formation and cardiac tissue integrity. *PLoS Genet* 9, e1003616.
- Dunipace, L., Ozdemir, A., Stathopoulos, A., 2011. Complex interactions between cis-regulatory modules in native conformation are critical for *Drosophila* snail expression. *Development* 138, 4075-4084.
- Fox, D., 2016. What sparked the Cambrian explosion? *Nature* 530, 268-270.
- Franch-Marro, X., Martin, N., Averof, M., Casanova, J., 2006. Association of tracheal placodes with leg primordia in *Drosophila* and implications for the origin of insect tracheal systems. *Development* 133, 785-790.
- Friedl, P., Gilmour, D., 2009. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 445-457.
- Garcia-Bellido, A., 1975. Genetic control of wing disc development in *Drosophila*. *Ciba Found Symp* 0, 161-182.
- Gebelein, B., McKay, D.J., Mann, R.S., 2004. Direct integration of Hox and segmentation gene inputs during *Drosophila* development. *Nature* 431, 653-659.
- Gervais, L., Casanova, J., 2010. In vivo coupling of cell elongation and lumen formation in a single cell. *Curr Biol* 20, 359-366.
- Ghabrial, A., Luschig, S., Metzstein, M.M., Krasnow, M.A., 2003. Branching morphogenesis of the *Drosophila* tracheal system. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 623-647.
- Glassford, W.J., Johnson, W.C., Dall, N.R., Smith, S.J., Liu, Y., Boll, W., Noll, M., Rebeiz, M., 2015. Co-option of an Ancestral Hox-Regulated Network Underlies a Recently Evolved Morphological Novelty. *Dev Cell* 34, 520-531.
- Glazer, L., Shilo, B.Z., 1991. The *Drosophila* FGF-R homolog is expressed in the embryonic tracheal system and appears to be required for directed tracheal cell extension. *Genes Dev* 5, 697-705.
- Hartenstein, V., 2006. The neuroendocrine system of invertebrates: a developmental and evolutionary perspective. *J Endocrinol* 190, 555-570.
- Hemavathy, K., Ashraf, S.I., Ip, Y.T., 2000. Snail/slug family of repressors: slowly going into the fast lane of development and cancer. *Gene* 257, 1-12.
- Hilbrant, M., Damen, W.G., McGregor, A.P., 2012. Evolutionary crossroads in developmental biology: the spider *Parasteatoda tepidariorum*. *Development* 139, 2655-2662.
- Hombria, J.C., Lovegrove, B., 2003. Beyond homeosis--HOX function in morphogenesis and organogenesis. *Differentiation* 71, 461-476.
- Hu, N., Castelli-Gair, J., 1999. Study of the posterior spiracles of *Drosophila* as a model to understand the genetic and cellular mechanisms controlling morphogenesis. *Dev Biol* 214, 197-210.
- Hurle, J.M., Ros, M.A., Climent, V., Garcia-Martinez, V., 1996. Morphology and significance of programmed cell death in the developing limb bud of the vertebrate embryo. *Microsc Res Tech* 34, 236-246.
- Ingham, P.W., Nakano, Y., Seger, C., 2011. Mechanisms and functions of Hedgehog signalling across the metazoa. *Nat Rev Genet* 12, 393-406.

- Khadjeh, S., Turetzek, N., Pechmann, M., Schwager, E.E., Wimmer, E.A., Damen, W.G., Prpic, N.M., 2012. Divergent role of the Hox gene *Antennapedia* in spiders is responsible for the convergent evolution of abdominal limb repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 4921-4926.
- Kim, J.S., Diebold, B.A., Kim, J.I., Kim, J., Lee, J.Y., Park, J.B., 2004. Rho is involved in superoxide formation during phagocytosis of opsonized zymosans. *J Biol Chem* 279, 21589-21597.
- Kim, S.K., Rulifson, E.J., 2004. Conserved mechanisms of glucose sensing and regulation by *Drosophila corpora cardiaca* cells. *Nature* 431, 316-320.
- King, R.C., Aggarwal, S.K., Bodenstein, D., 1966. The comparative submicroscopic morphology of the ring gland of *Drosophila melanogaster* during the second and third larval instars. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 73, 272-285.
- Kolsch, V., Seher, T., Fernandez-Ballester, G.J., Serrano, L., Leptin, M., 2007. Control of *Drosophila* gastrulation by apical localization of adherens junctions and RhoGEF2. *Science* 315, 384-386.
- Kosman, D., Ip, Y.T., Levine, M., Arora, K., 1991. Establishment of the mesoderm-neuroectoderm boundary in the *Drosophila* embryo. *Science* 254, 118-122.
- Lemons, D., McGinnis, W., 2006. Genomic evolution of Hox gene clusters. *Science* 313, 1918-1922.
- Lessing, D., Nusse, R., 1998. Expression of wingless in the *Drosophila* embryo: a conserved cis-acting element lacking conserved Ci-binding sites is required for patched-mediated repression. *Development* 125, 1469-1476.
- Letizia, A., Sotillos, S., Campuzano, S., Llimargas, M., 2011. Regulated Crb accumulation controls apical constriction and invagination in *Drosophila* tracheal cells. *J Cell Sci* 124, 240-251.
- Levine, M., 2010. Transcriptional enhancers in animal development and evolution. *Curr Biol* 20, R754-763.
- Lewis, E.B., 1978. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276, 565-570.
- Lohmann, I., McGinnis, N., Bodmer, M., McGinnis, W., 2002. The *Drosophila* Hox gene deformed sculpts head morphology via direct regulation of the apoptosis activator reaper. *Cell* 110, 457-466.
- Lovegrove, B., Simoes, S., Rivas, M.L., Sotillos, S., Johnson, K., Knust, E., Jacinto, A., Hombria, J.C., 2006. Coordinated control of cell adhesion, polarity, and cytoskeleton underlies Hox-induced organogenesis in *Drosophila*. *Curr Biol* 16, 2206-2216.
- Lu, P., Weaver, V.M., Werb, Z., 2012. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol* 196, 395-406.
- Majumder, P., Aranjuez, G., Amick, J., McDonald, J.A., 2012. Par-1 controls myosin-II activity through myosin phosphatase to regulate border cell migration. *Curr Biol* 22, 363-372.
- Martin-Belmonte, F., Perez-Moreno, M., 2011. Epithelial cell polarity, stem cells and cancer. *Nat Rev Cancer* 12, 23-38.
- Matozaki, T., Nakanishi, H., Takai, Y., 2000. Small G-protein networks: their crosstalk and signal cascades. *Cell Signal* 12, 515-524.
- Matsuda, R., Hosono, C., Saigo, K., Samakovlis, C., 2015. The intersection of the extrinsic hedgehog and WNT/wingless signals with the intrinsic Hox code underpins branching pattern and tube shape diversity in the *drosophila* airways. *PLoS Genet* 11, e1004929.

- Mayor, R., Etienne-Manneville, S., 2016. The front and rear of collective cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17, 97-109.
- McDonald, J.A., Khodyakova, A., Aranjuez, G., Dudley, C., Montell, D.J., 2008. PAR-1 kinase regulates epithelial detachment and directional protrusion of migrating border cells. *Curr Biol* 18, 1659-1667.
- Merabet, S., Hombria, J.C., Hu, N., Pradel, J., Graba, Y., 2005a. Hox-controlled reorganisation of intrasegmental patterning cues underlies *Drosophila* posterior spiracle organogenesis. *Development* 132, 3093-3102.
- Merabet, S., Mann, R.S., 2016. To Be Specific or Not: The Critical Relationship Between Hox And TALE Proteins. *Trends Genet* 32, 334-347.
- Merabet, S., Pradel, J., Graba, Y., 2005b. Getting a molecular grasp on Hox contextual activity. *Trends Genet* 21, 477-480.
- Minoux, M., Rijli, F.M., 2010. Molecular mechanisms of cranial neural crest cell migration and patterning in craniofacial development. *Development* 137, 2605-2621.
- Mirth, C., Truman, J.W., Riddiford, L.M., 2005. The role of the prothoracic gland in determining critical weight for metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Curr Biol* 15, 1796-1807.
- Mohler, J., Vani, K., 1992. Molecular organization and embryonic expression of the hedgehog gene involved in cell-cell communication in segmental patterning of *Drosophila*. *Development* 115, 957-971.
- Montell, D.J., Yoon, W.H., Starz-Gaiano, M., 2012. Group choreography: mechanisms orchestrating the collective movement of border cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 631-645.
- Noro, B., Culi, J., McKay, D.J., Zhang, W., Mann, R.S., 2006. Distinct functions of homeodomain-containing and homeodomain-less isoforms encoded by homothorax. *Genes Dev* 20, 1636-1650.
- Ohlund, D., Franklin, O., Lundberg, E., Lundin, C., Sund, M., 2013. Type IV collagen stimulates pancreatic cancer cell proliferation, migration, and inhibits apoptosis through an autocrine loop. *BMC Cancer* 13, 154.
- Park, S., Bustamante, E.L., Antonova, J., McLean, G.W., Kim, S.K., 2011. Specification of *Drosophila* corpora cardiaca neuroendocrine cells from mesoderm is regulated by Notch signaling. *PLoS Genet* 7, e1002241.
- Perrin, L., Monier, B., Ponzielli, R., Astier, M., Semeriva, M., 2004. *Drosophila* cardiac tube organogenesis requires multiple phases of Hox activity. *Dev Biol* 272, 419-431.
- Perry, M.W., Boettiger, A.N., Bothma, J.P., Levine, M., 2010. Shadow enhancers foster robustness of *Drosophila* gastrulation. *Curr Biol* 20, 1562-1567.
- Pick, L., Heffer, A., 2012. Hox gene evolution: multiple mechanisms contributing to evolutionary novelties. *Ann N Y Acad Sci* 1256, 15-32.
- Pinheiro, E.M., Montell, D.J., 2004. Requirement for Par-6 and Bazooka in *Drosophila* border cell migration. *Development* 131, 5243-5251.
- Port, F., Chen, H.M., Lee, T., Bullock, S.L., 2014. Optimized CRISPR/Cas tools for efficient germline and somatic genome engineering in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, E2967-2976.
- Ramel, D., Wang, X., Laflamme, C., Montell, D.J., Emery, G., 2013. Rab11 regulates cell-cell communication during collective cell movements. *Nat Cell Biol* 15, 317-324.

- Ran, F.A., Hsu, P.D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D.A., Zhang, F., 2013. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* 8, 2281-2308.
- Rewitz, K.F., Yamanaka, N., O'Connor, M.B., 2013. Developmental checkpoints and feedback circuits time insect maturation. *Curr Top Dev Biol* 103, 1-33.
- Ribeiro, C., Neumann, M., Affolter, M., 2004. Genetic control of cell intercalation during tracheal morphogenesis in *Drosophila*. *Curr Biol* 14, 2197-2207.
- Ridley, A.J., 2001. Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci* 114, 2713-2722.
- Ryoo, H.D., Mann, R.S., 1999. The control of trunk Hox specificity and activity by Extradenticle. *Genes Dev* 13, 1704-1716.
- Ryschich, E., Khamidjanov, A., Kerkadze, V., Buchler, M.W., Zoller, M., Schmidt, J., 2009. Promotion of tumor cell migration by extracellular matrix proteins in human pancreatic cancer. *Pancreas* 38, 804-810.
- Sambrani, N., Hudry, B., Maurel-Zaffran, C., Zouaz, A., Mishra, R., Merabet, S., Graba, Y., 2013. Distinct molecular strategies for Hox-mediated limb suppression in *Drosophila*: from cooperativity to dispensability/antagonism in TALE partnership. *PLoS Genet* 9, e1003307.
- Scarpa, E., Szabo, A., Bibonne, A., Thevenneau, E., Parsons, M., Mayor, R., 2015. Cadherin Switch during EMT in Neural Crest Cells Leads to Contact Inhibition of Locomotion via Repolarization of Forces. *Dev Cell* 34, 421-434.
- Schafer, G., Narasimha, M., Vogelsang, E., Leptin, M., 2014. Cadherin switching during the formation and differentiation of the *Drosophila* mesoderm - implications for epithelial-to-mesenchymal transitions. *J Cell Sci* 127, 1511-1522.
- Shaye, D.D., Casanova, J., Llimargas, M., 2008. Modulation of intracellular trafficking regulates cell intercalation in the *Drosophila* trachea. *Nat Cell Biol* 10, 964-970.
- Simoës-Costa, M., Bronner, M.E., 2015. Establishing neural crest identity: a gene regulatory recipe. *Development* 142, 242-257.
- Slattery, M., Riley, T., Liu, P., Abe, N., Gomez-Alcala, P., Dror, I., Zhou, T., Rohs, R., Honig, B., Bussemaker, H.J., Mann, R.S., 2011. Cofactor binding evokes latent differences in DNA binding specificity between Hox proteins. *Cell* 147, 1270-1282.
- Sotillos, S., Espinosa-Vazquez, J.M., Foglia, F., Hu, N., Hombria, J.C., 2010. An efficient approach to isolate STAT regulated enhancers uncovers STAT92E fundamental role in *Drosophila* tracheal development. *Dev Biol* 340, 571-582.
- Stramer, B., Mayor, R., 2016. Mechanisms and in vivo functions of contact inhibition of locomotion. *Nat Rev Mol Cell Biol*.
- Sutherland, D., Samakovlis, C., Krasnow, M.A., 1996. branchless encodes a *Drosophila* FGF homolog that controls tracheal cell migration and the pattern of branching. *Cell* 87, 1091-1101.
- Tao, Y., Schulz, R.A., 2007. Heart development in *Drosophila*. *Semin Cell Dev Biol* 18, 3-15.
- Thevenneau, E., Mayor, R., 2012. Neural crest migration: interplay between chemorepellents, chemoattractants, contact inhibition, epithelial-mesenchymal transition, and collective cell migration. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 1, 435-445.
- Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y., Nieto, M.A., 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871-890.

- Van Doren, M., Williamson, A.L., Lehmann, R., 1998. Regulation of zygotic gene expression in *Drosophila* primordial germ cells. *Curr Biol* 8, 243-246.
- Vicente-Manzanares, M., Webb, D.J., Horwitz, A.R., 2005. Cell migration at a glance. *J Cell Sci* 118, 4917-4919.
- Wang, X., He, L., Wu, Y.I., Hahn, K.M., Montell, D.J., 2010. Light-mediated activation reveals a key role for Rac in collective guidance of cell movement in vivo. *Nat Cell Biol* 12, 591-597.
- Warren, J.T., Petryk, A., Marques, G., Parvy, J.P., Shinoda, T., Itoyama, K., Kobayashi, J., Jarcho, M., Li, Y., O'Connor, M.B., Dauphin-Villemant, C., Gilbert, L.I., 2004. Phantom encodes the 25-hydroxylase of *Drosophila melanogaster* and *Bombyx mori*: a P450 enzyme critical in ecdysone biosynthesis. *Insect Biochem Mol Biol* 34, 991-1010.
- White, K., Grether, M.E., Abrams, J.M., Young, L., Farrell, K., Steller, H., 1994. Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*. *Science* 264, 677-683.
- Wilk, R., Weizman, I., Shilo, B.Z., 1996. trachealess encodes a bHLH-PAS protein that is an inducer of tracheal cell fates in *Drosophila*. *Genes Dev* 10, 93-102.
- Wu, X., Golden, K., Bodmer, R., 1995. Heart development in *Drosophila* requires the segment polarity gene wingless. *Dev Biol* 169, 619-628.
- Xu, H., Ye, D., Behra, M., Burgess, S., Chen, S., Lin, F., 2014. Gbeta1 controls collective cell migration by regulating the protrusive activity of leader cells in the posterior lateral line primordium. *Dev Biol* 385, 316-327.
- Yin, Z., Xu, X.L., Frasch, M., 1997. Regulation of the twist target gene tinman by modular cis-regulatory elements during early mesoderm development. *Development* 124, 4971-4982.
- Zelzer, E., Shilo, B.Z., 2000. Interaction between the bHLH-PAS protein Trachealess and the POU-domain protein Drifter, specifies tracheal cell fates. *Mech Dev* 91, 163-173.

Agradecimientos

Hubiese sido imposible imaginar en el año 2011, cuando comencé el doctorado en el CABD, el gran número de personas verdaderamente increíbles que iba a tener la oportunidad de conocer. Y como no, una de las primeras fue mi Director de tesis, Jaime.

Recuerdo perfectamente un día Lunes 3 de Enero en el *Fly Room*, en el que Jaime empezó a ponerme en la placa de CO₂ todo tipo de mosca mutante, seguido de la gran pregunta: ¿Sabes lo que es un balanceador?. La respuesta fue sincera. No lo sé. Jaime amablemente me lo explicó y desde ese momento hasta la actualidad no he dejado de aprender, ya sea a través de una explicación escrita en un folio, o casi una tarde entera discutiendo sobre todo tipo de hipótesis y experimentos. Esas discusiones, con una persona de la altísima talla científica de Jaime, han sido sin duda alguna uno de los mayores privilegios que he tenido estos años. También todos los buenos consejos personales, más allá del laboratorio y de la ciencia han sido muy valiosos para mí. Nunca le podré agradecer suficientemente por todo lo aprendido y por toda la confianza que ha depositado en mí desde el principio. Siempre será una de mis principales referencias más allá de esta tesis.

Respecto al resto de mi laboratorio, he compartido grandes momentos con muchos de mis compañeros. Recuerdo con especial cariño a Mario, Calero, Patri (la de Acaimo), MariCarmen, Marisa, Sara, Aurora, así como Miriam, David y John del laboratorio de Quim, por muchos buenos ratos de risas vividos. Especial mención a Marisa y MariCarmen, compañeras de confidencias, cafés y ratos en inmejorable compañía. El paso de Aurora ("Aurorina") por el lab y poder contribuir a que hiciese un bonito trabajo de fin de carrera fue una fantástica experiencia. Compartir discusiones científicas espontáneamente o en *lab meetings* con Post-Docs como Paco, Pedro y Sol, ha sido muy interesante. Especialmente con Quim, al que no pocas veces llamé a su despacho para preguntarle dudas u opiniones. Y ya al final de la tesis, ha sido un placer coincidir con Mar ("Marsita") al inicio de su tesis, que seguro tendrá muchos éxitos.

El siguiente laboratorio, que ha sido como mi segunda casa, es el 111-114 (son dos en realidad). El 111-114 dirigido por Lola y Acaimo, ha sido, es y será, una fábrica de buena ciencia y de grandísimos científicos al que tengo mucho que agradecer.

Empiezo por Juanjo. Al principio de conocer a Juanjo, me caía muy bien pero no hablábamos mucho. A día de hoy, es uno de mis mejores amigos, por el que siento enorme admiración. Besaid, indescriptible por naturaleza, es fuerza, es carácter, pero sobre todo una gran persona y amigo, otro gran Doctor que ha dado el CABD. A Bea Ibáñez, no solo le tengo mucho cariño sino que le estoy muy agradecido por recibirme siempre que entraba al laboratorio con una sonrisa muy alegre y proporcionarme moscas muy rápido. Bea Estrada, siempre amable conmigo y *Drosophilista* de referencia. Alicia, lo mejor de lo mejor que ha dado Venezuela, siempre brindándome una sonrisa. María Lobo, es sin duda una persona única y especial, que llena de alegría Acaimo's lab. Una auténtica *mastermind*. Fue también estupendo haber conocido a una persona tan increíble como Mari Carmen. Guardo también un gran recuerdo de Cecilia, Alfonso, y también de María Jesús. Adrián y Dilann son dos grandes recientes fichajes con mucho y buen futuro por delante.

No sé si agradecer a Patri (Asturiana) por ser tan simpática, o a Asturias por habérmola regalado. Y al final, pero no menos importante Andrea y Carmina. Andrea, por ser siempre tan dulce, e incorruptiblemente buena persona. Otro regalo del Norte de la Península Ibérica. Carmina, fue una incorporación más reciente, y que sin embargo, se ha convertido en una de las personas más imprescindibles del 111-114. Además de alumna aventajada del té Matcha, junto con Andrea y María Lobo.

A todos vosotros presentes y antiguos miembros del 111-114, GRACIAS.

Víctor (Tallada). Conocí a Víctor, cuando alguien me comentó que le pidiera a él, un “tipo” que trabajaba con levaduras, un vector con el gen mCherry que necesitaba. Así que fui a su laboratorio y se lo pedí muy amablemente. Nunca me dio el vector, pero gracias a aquella visita conocí a un gran científico, capaz de dibujarte en una servilleta todos los *checkpoints* del ciclo celular, y actual gran querido amigo.

Corín. Qué no puedo decir de Corín. Más allá de ser una persona maravillosa e irrepetible, así como una grandísima amiga que llevaré siempre en el corazón, ha sido mi gran apoyo en muchos momentos.

Katherina. El CABD puede comprar los equipos de microscopía más sofisticados, pero una profesional como Kathy no tiene precio. Seguiremos usando las cajas de cartón vacías para esconderte.

Casares’s Lab. Laboratorio vecino y amigo, donde he conocido gente muy interesante de muy diversos sitios, pero sin duda las personas que más me han marcado han sido Marta Neto, Gema Villa, Antonella y Amer. Antonella por ser siempre tan amable conmigo. A “Villis”, le agradezco esos momentos de sabiduría y buenas conversaciones que me han hecho reír tanto. Con Amer he pasado grandes momentos de risas, así como de ópera en directo. Un amigo inolvidable.

A Marta Neto, *Drosophila* de primer nivel, le agradezco el ser siempre tan simpática, con ese humor que solo ella tiene y sobre todo por hacerme sentir tan orgulloso de ser su amigo.

Diana (Casares’s lab). Mi relación con Diana al principio, era bastante similar a la que tuve con Juanjo, me parecía brillante, simpática, pero no hablábamos mucho. A día de hoy, entre muchas cosas, quiero darte las gracias por todos los días en los que me has llenado de luz con tu sonrisa.

Otro privilegio que he tenido estos años, y por el que me siento agradecido, ha sido compartir espacio y aprender de investigadores de la talla de Lola y Acaimo, Fernando Casares, Quim, Juan Ramón, Maria José y Jose Luis Skarmeta.

Además de la gente más próxima a mi estos años, he encontrado gente estupenda repartida por todo el CABD, como el personal de administración, en especial a Carmen de León y Beluca, Laura Tomas de proteómica, cocinas, etc. A todos ellos les agradezco el haberme ayudado con su excelente labor diaria.

Por otro lado, mi andadura científica durante la tesis me ha permitido ir a diversos congresos donde he aprendido mucho y conocido a grandes científicos. Pero sobre todo, me ha enriquecido mucho a nivel personal y profesional el tener la gran oportunidad de realizar cuatro estancias breves de investigación en los laboratorios del Dr. Michalis Averof, Dr. Alistair MacGregor, Dr. Michael Akam y ya al final de mi tesis con el Dr. Richard Mann.

De esas estancias me llevo tres grandes amigos. Marco Grillo (Averof Lab) Roumen Voutev (Mann lab) e Isabel (Miss Kerrigan). Marco Grillo, dice que es Italiano, pero yo creo que es Español del norte. Una persona increíble, sabia y gran amigo. Roumen, no solo fue un maestro en el laboratorio sino un amigo imprescindible durante la estancia, y que lo seguirá siendo después de la misma. Isabel. Conocí a Isabel durante mi estancia en NYC, donde ella empezaba su andadura en Desplan lab. Pocas veces tiene uno la suerte de conocer a una alumna aventajada de Margarita Salas (sí, lo confieso, soy fan de Margarita), simpatiquísima y con un futuro prometedor.

Y finalmente, que duda cabe, que no podría haber llegado a este momento crítico y especial en la vida, sin la ayuda incondicional de mis padres y abuelos. Que me lo han proporcionado absolutamente todo, sin pedir nada más a cambio que haga realidad mis sueños. Mi madre, María del Mar, requeriría un libro de agradecimientos para ella sola. Solo darte las gracias por existir. Y respecto a mi padre, en su memoria, entre muchas cosas buenas, quiero destacar que estoy convencido de que él me transmitió la pasión por la ciencia. Mi hermano Alejandro, 9 años menor que yo, pero que ya me aventaja en muchos aspectos más de 100, hace que me sienta realmente muy orgulloso de ser su hermano. Sé que llegarás muy lejos. Mis abuelos son también mi orgullo y la razón de que pueda haber llegado hasta aquí.

MUCHAS GRACIAS A TODOS.

